

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Reversible Atrophie der Peyer-Plaques im Rahmen
systemischer virusassoziierter Immunaktivierung:
Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernadette Andrea Maria Bohn

aus Aichach

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Bocker

Prof. Dr. Heiko Adler

Prof. Dr. Andreas Eigler

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. habil. Simon Heidegger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2017

Für Bene und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergründe	1
1.1.1	Grenzflächen des Organismus zur Umwelt und ihre Immunabwehr	1
1.1.1.1	Immunkompartimente des Darms.....	1
1.1.1.2	Die Haut und periphere Lymphknoten (PLN).....	2
1.1.2	Zirkulation und Migration von Lymphozyten.....	3
1.1.2.1	Migration in sekundäre lymphatische Organe	3
1.1.2.2	Rezirkulation der Lymphozyten	6
1.1.3	Immunreaktion bei systemischer Virusinfektion	8
1.1.3.1	Erkennung von Erregern durch Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems	8
1.1.3.2	Zytokinproduktion im Rahmen einer antiviralen Immunantwort.....	10
1.1.3.3	Einfluss auf Reifung und Verteilung verschiedener Zelltypen des Immunsystems.....	11
1.2	Fragestellung	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material	15
2.1.1	Technische Ausstattung	15
2.1.2	Chemikalien, Zellkulturmaterialien und andere Reagenzien	15
2.1.3	Medien und Puffer	18
2.1.4	TLR-Liganden, Zytokine und Antikörper.....	20
2.1.5	Viren	20
2.1.6	Western-Blot-Zubehör	21
2.1.7	Primer und Probes	21
2.1.8	FACS-Antikörper und intrazelluläre Farbstoffe.....	21
2.1.9	Kits	22
2.1.10	Software	23
2.2	Tierexperimente	23
2.2.1	Versuchstiere	23
2.2.2	Organentnahme und Erstellung von Einzelzellsuspensionen	23
2.2.3	Poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	24
2.2.4	<i>In vivo</i> BrdU-Proliferations-Assay.....	24

2.2.5	<i>In vivo</i> Migrations-Assay: Adoptiver B-Zell-Transfer	24
2.2.6	Adoptiver B-Zell-Transfer nach FTY720-Behandlung <i>in vivo</i>	25
2.3	Zellkultur	26
2.3.1	Zellzahlbestimmung	26
2.3.2	Isolation von CD19 ⁺ B-Lymphozyten	26
2.3.3	<i>In vitro</i> Stimulationen mit TLR-Liganden und Zytokinen	26
2.3.4	Kultivierung von Splenozyten in der Gegenwart von Viren	27
2.3.5	<i>In vitro</i> Chemotaxis-Assay	27
2.3.6	<i>In vitro</i> MAdCAM-1-Adhäsions-Assay	28
2.4	Durchflusszytometrie	29
2.4.1	Methodisches Prinzip	29
2.4.2	Extrazellulärfärbung	31
2.4.3	Intrazellulärfärbung	31
2.4.3.1	Färbung mit Cell Tracking-Farbstoffen	31
2.4.3.2	Intrazelluläre BrdU-Färbung	32
2.4.4	Apoptose-Färbung	32
2.5	Protein-Analyse	33
2.5.1	Extraktion zellulärer Proteine	33
2.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.5.3	Western Blot zur S1P ₁ -Bestimmung	34
2.6	Molekularbiologische Methoden	34
2.6.1	Isolation zytoplasmatischer RNA	34
2.6.2	Reverse Transkription	35
2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.6.3.1	Methodisches Prinzip	35
2.6.3.2	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	36
2.7	Statistische Analyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Zellumsatz in den Peyer-Plaques und PLN nach poly(I:C)-Behandlung	37
3.1.1	Einfluss von poly(I:C) auf die Zellularität der Peyer-Plaques und PLN	37
3.1.2	Einfluss von poly(I:C) auf die B-Zell Proliferation in den Peyer-Plaques und PLN	38
3.1.3	Einfluss von poly(I:C) auf die B-Zell Apoptose-Rate in den Peyer-Plaques und PLN	39

3.2 Die Regulation des Ausstroms von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen durch poly(I:C)	40
3.2.1 Transkriptionelle Regulation von S1P ₁ in B-Lymphozyten aus Peyer-Plaques und PLN von poly(I:C)-behandelten Mäusen	41
3.2.2 S1P ₁ -Expression auf B-Lymphozyten in Peyer-Plaques und PLN von poly(I:C)-behandelten Mäusen	42
3.2.3 Chemotaxis Richtung S1P von Lymphozyten aus Peyer-Plaques und PLN nach poly(I:C)-Behandlung	44
3.3 Der Einfluss von poly(I:C) und Typ-I-IFN auf die Migration von B-Lymphozyten in die Peyer-Plaques und PLN	46
3.3.1 Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Stimulation mit Typ-I-IFN <i>in vitro</i>	46
3.3.2 Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach <i>in vitro</i> Kultivierung in der Gegenwart von Viren	47
3.3.3 Adhäsion IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten an MAdCAM-1 <i>in vitro</i>	48
3.3.4 Migrationsverhalten IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten <i>in vivo</i>	50
3.3.5 Migrationsphänotyp von B-Lymphozyten <i>in vivo</i> nach Behandlung mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ und CD62L	52
3.3.6 Einfluss von FTY720 auf die <i>short-term</i> Migration IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten in die Peyer-Plaques	53
3.4 Zeitlicher Verlauf der Expression von $\alpha_4\beta_7$	55
4 Diskussion	56
4.1 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	56
4.1.1 Apoptose und Proliferation spielen keine Rolle bei der Entstehung atropher Peyer-Plaques nach poly(I:C)-Behandlung	56
4.1.2 Der S1P ₁ -abhängige Ausstrom von Lymphozyten ist nach poly(I:C)-Behandlung in Peyer-Plaques und PLN gleichermaßen verringert	57
4.1.3 Die Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ führt zu verminderter Migration in die Peyer-Plaques nach virusassoziiertem Immunaktivierung	57
4.1.3.1 Mögliche zelluläre Mechanismen der Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$	58
4.1.3.2 Virus ist nicht gleich Virus – Kultivierung mit verschiedenen Viren führt zu unterschiedlicher Regulation der Homing-Moleküle	59
4.1.3.3 MAdCAM-1-Adhäsions-Assay und blockierende Antikörper bestätigen den postulierten Mechanismus	60
4.1.3.4 Der Einfluss von FTY720 auf die Migration von B-Lymphozyten	60

4.2	Integrine als Regulatoren der Architektur lymphatischer Organe	61
4.2.1	$\alpha_4\beta_7$ ist entscheidend für die Entwicklung und Homöostase der Peyer-Plaques	61
4.2.2	Überlappende Funktionen der Adhäsionsmoleküle gewährleisten Aufrechterhaltung der Migration in die übrigen sekundären lymphatischen Organe	62
4.3	Die Rolle des Darms im Rahmen systemischer Immunaktivierung.....	63
4.3.1	Die verminderte Zellularität der PP als Teil einer Regulation der systemischen Immunantwort.....	63
4.3.2	Auswirkungen auf die Barrierefunktion und Immunabwehr des Darms	64
4.4	Relevanz für moderne therapeutische Regimes.....	64
4.4.1	Therapeutische Nutzung von poly(I:C) und IFN- α	64
4.4.1.1	<i>Klinischer Einsatz und mögliche Komplikationen</i>	<i>65</i>
4.4.1.2	<i>IFN-α: Beschränkungen der anti-viralen Potenz.....</i>	<i>66</i>
4.4.2	$\alpha_4\beta_7$ als therapeutische Zielstruktur.....	66
4.4.2.1	<i>Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen</i>	<i>66</i>
4.4.2.2	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>	<i>67</i>
4.4.2.3	<i>HIV.....</i>	<i>68</i>
5	Zusammenfassung	70
6	Abkürzungsverzeichnis	71
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	75
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	75
7.2	Tabellenverzeichnis.....	76
8	Literaturverzeichnis.....	77
9	Veröffentlichungen	90
9.1	Originalarbeiten	90
9.2	Posterpräsentation	90
9.3	Mündliche Präsentationen	90
10	Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Hintergründe

1.1.1 Grenzflächen des Organismus zur Umwelt und ihre Immunabwehr

Der Gastrointestinaltrakt (GIT), die Haut und die Atemwege sind aufgrund ihrer enormen Oberfläche in konstantem und intensivem Kontakt zur Umwelt. Eine suffiziente Versorgung dieser Organe mit Lymphozyten und anderen Zellen des Immunsystems ist daher unabdingbar für intakte Abwehrmechanismen und somit die Aufrechterhaltung dieser Organe als Barriere gegen Erreger und Schadstoffe.

1.1.1.1 Immunkompartimente des Darms

Der Verdauungstrakt weist eine ausgedehnte mukosale Oberfläche und damit Grenzfläche zur Umwelt auf, die bereits im Dünndarm mehr als 200 m² beträgt [Welsch, 2006]. Er spielt daher nicht nur in der Verdauung und Resorption von Nahrungsbestandteilen eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Erkennung von Fremdorganismen und der Unterscheidung von pathogenen und kommensalen Erregern. Es erstaunt daher nicht, dass sich hier ein großer Anteil der Zellen des Immunsystems befindet [Jung et al., 2010; R. Pabst et al., 2008]. Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) besteht aus einzelnen Lymphfollikeln, der Appendix vermiformis und gruppierten Follikelansammlungen, den Peyer-Plaques (*Peyer's patches*, PP) [Brandtzaeg et al., 2008; Neutra et al., 2001]. Diese sind beim Menschen größtenteils im terminalen Ileum lokalisiert und stellen ovale Strukturen dar [Corney, 1965; Van Kruiningen et al., 2002]. Die einzelnen Follikelaggregate sind von einer Zone bedeckt, dem *subepithelial dome*, in dem sich je nach Zustand vor allem dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) [Kelsall und Strober, 1996] sowie B-Lymphozyten befinden [Ahlawat et al., 2014]. Diese Zellschicht interagiert direkt mit dem darüberliegenden Epithel [Brandtzaeg et al., 1999; Mowat, 2003]. Dieses follikelassoziierte Epithel ist eine spezialisierte Zellschicht und unterscheidet sich in der Zellzusammensetzung und seinen Eigenschaften von der restlichen Darmschleimhaut. Es bildet die Grenzschicht zwischen dem Darmlumen und dem darunterliegenden lymphatischen Gewebe und enthält sogenannte M-Zellen (Mikrofaltenzellen, *microfold cells*) [Neutra et al., 1996]. Diese nehmen Bakterien und luminale Antigene auf und vermitteln sie an die basal liegenden Lymphozyten und das lymphatische Gewebe wie

den PP. Hier wird je nach Antigen entweder eine adaptive Immunantwort ausgelöst [Neutra et al., 1996; Rumbo et al., 2004] oder eine gewisse immunologische Toleranz entwickelt, bspw. gegenüber der kommensalen Darmflora [Mowat, 2003]. Vor diesem Hintergrund ist die Gegenwart kommensaler Bakterien nicht nur notwendig für die Verdauung gewisser Nahrungsbestandteile oder die Synthese wichtiger Vitamine, sondern spielt im Tiermodell auch für die Entwicklung der PP eine wichtige Rolle [Cornes, 1965; Miyakawa, 1959].

Über die zelluläre Zusammensetzung der PP beim Menschen ist aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit eher wenig bekannt, während diese Lymphfollikel in der Maus gut untersucht sind. Die murinen PP bestehen zu ca. 60-70% aus B220⁺ B-Lymphozyten, zu ca. 25% aus CD3⁺ T-Lymphozyten, zu ca. 10% aus DCs und zu weniger als 5% aus anderen Zelltypen [Ahlawat et al., 2014; Barreau et al., 2007; Jung et al., 2010]. Betrachtet man die Architektur der Follikel, so findet man zentrale Ansammlungen von B-Zellen und follikulären DCs, die von T-Zell-reichen Zonen umgeben sind [Ahlawat et al., 2014; Kelsall und Strober, 1996]. In diesen befinden sich spezialisierte postkapilläre Venolen (sogenannte *high endothelial venules*, HEV), über die Lymphozyten die PP erreichen können. Der Ausstrom erfolgt über efferente Lymphgefäße in Richtung der mesenterialen Lymphknoten (*mesenteric lymph nodes*, MLN) [Jung et al., 2010].

1.1.1.2 Die Haut und periphere Lymphknoten (PLN)

Die Haut erfüllt essentielle Aufgaben wie Wärmeregulation, Sensorik, Bildung einer physikalischen und chemischen Barriere, sowie einer effektiven Immunabwehr. Hierfür steht eine Reihe von Zelltypen zur Verfügung, die je nach Hautschicht unterschiedlich stark vertreten sind und gemeinsam das Eindringen bzw. die Ausbreitung pathogener Erreger verhindern [Heath und Carbone, 2013]. So finden sich hier u.a. Makrophagen, Mastzellen, CD8⁺ T-Lymphozyten, Langerhans-Zellen (epidermale DCs) und dermale DCs. Die DCs nehmen in den entsprechenden Hautschichten Antigene auf und migrieren anschließend über afferente Lymphbahnen in die regionalen Lymphknoten. Dort präsentieren sie Lymphozyten das Antigen, können diese aktivieren und so eine adaptive Immunantwort auslösen [Igyarto und Kaplan, 2013; Kaplan, 2010].

Beim Menschen finden sich ca. 600 – 700 Lymphknoten, die peripher vor allem zervikal, axillär und inguinal zu finden sind (*peripheral lymph nodes*, PLN), zudem paraaortal oder mesenterial [Welsch, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden stellvertretend für alle Haut-drainierenden PLN axilläre und inguinale Lymphknoten untersucht, für Mukosa-drainierende Lymphknoten mesenteriale Lymphknoten (*mesenteric lymph nodes*, MLN).

1.1.2 Zirkulation und Migration von Lymphozyten

Auch wenn sich die einzelnen lymphatischen Organe in ihrer jeweiligen Struktur unterscheiden, zeigen sie prinzipiell denselben Grundaufbau. Ihr Zweck liegt darin, die Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen an migrierende Lymphozyten zu optimieren und somit eine effektive adaptive Immunantwort und -abwehr zu ermöglichen. Da pro T-Zell-Rezeptor für die spezifische Antigenerkennung nur wenige Klone verfügbar sind [von Andrian und Mackay, 2000], muss die Verteilung der Lymphozyten mit Hilfe der sekundären lymphatischen Organe (SLO) gut reguliert werden. Somit ist das Immunsystem als systemisches Organ charakterisiert durch und angewiesen auf die Zirkulation von Lymphozyten. Die Grundlagen für die Migration in und aus lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen und Geweben werden im Folgenden dargestellt.

1.1.2.1 Migration in sekundäre lymphatische Organe

Um ihre Funktion der Immunabwehr zu erfüllen, verlassen reife naive T- und B-Zellen den Thymus bzw. das Knochenmark, um in SLO wie die Milz, Lymphknoten oder die PP zu migrieren und Antigene zu detektieren [Cyster und Schwab, 2012]. Die Migration von Lymphozyten in lymphatisches Gewebe erfolgt über HEV durch die Interaktion von Lymphozyten und Endothelzellen über eine Abfolge gewisser Schritte. Vermittelt wird der Zell-Zell-Kontakt durch Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Chemokinrezeptoren und Integrine [von Andrian und Mackay, 2000; von Andrian und Mempel, 2003]. Letztere sind konstitutiv exprimierte Oberflächenrezeptoren, deren Liganden aus der extrazellulären Matrix stammen, auf der Oberfläche anderer Zellen lokalisiert oder löslich sind [Hynes, 1992]. Integrine sind $\alpha\beta$ -heterodimere Transmembranmoleküle, wobei bisher 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt sind, die insgesamt 24 unterschiedliche Heterodimere bilden und so eine Vielzahl an spezifischen Zell-Zell-Interaktionen ermöglichen [Shimaoka und Springer, 2003]. Über ihren Kontakt zum Zytoskelett der Zelle übermitteln die Integrine je nach Ligand unterschiedlichste Signale nach intrazellulär, ebenso wie die Integrine im Gegenzug von intrazellulär in ihrer Aktivität und Funktion beeinflusst werden können. Somit werden über diese multifunktionalen Oberflächenmoleküle Signale bzgl. Adhäsion, Apoptose, Form, Beweglichkeit oder Differenzierung übermittelt [Hynes, 2002; Takada et al., 2007].

Bedeutende Strukturen für die vorliegende Arbeit

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist das Integrin $\alpha_4\beta_7$ (*lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1*, LPAM-1, **Abbildung 1.1**), ein *Homing*-Molekül, das u.a. die Migration in die PP vermittelt [Hamann et al., 1994; Holzmann et al., 1989]. Sein Ligand *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) aus der Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle ist u. a. auf den HEV der PP, der MLN und der intestinalen Lamina propria exprimiert [Berlin et al., 1993; Streeter et al., 1988]. Darüber hinaus kann $\alpha_4\beta_7$ jedoch auch *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und Fibronectin binden [Postigo et al., 1993].

Die entsprechenden Adhäsionsmoleküle für die Migration in die PLN sind das Integrin $\alpha_L\beta_2$ (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*, LFA-1) und dessen endothelialer Ligand *Intercellular Cell Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) [Andrew et al., 1998; von Andrian und Mackay, 2000]. Darüber hinaus initiiert *L-Selectin* (CD62L, **Abbildung 1.1**) durch die Bindung an *peripheral node addressin* (PNAd) die Adhäsionskaskade und spielt für die Migration in die PLN eine wichtige Rolle [Warnock et al., 1998], kann aber auch an MAdCAM-1 binden [Berg et al., 1993].

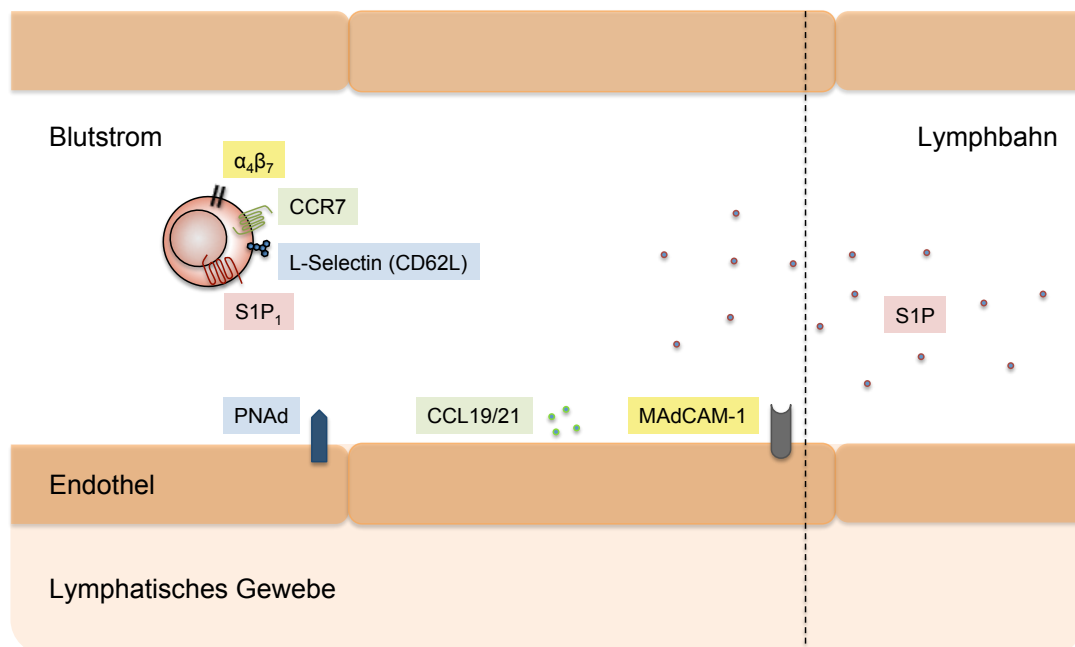


Abbildung 1.1: Bedeutende Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Liganden für die vorliegende Arbeit. Blau: Das Selektin CD62L und dessen endothelialer Ligand PNAd (bzw. MAdCAM-1). Gelb: Das Integrin $\alpha_4\beta_7$ und dessen endothelialer Ligand MAdCAM-1. Grün: Der Chemokinrezeptor CCR7 und dessen Liganden CCL19/21. Rot: Der Rezeptor S1P₁ und dessen Ligand S1P (siehe 1.1.2.2).

Die Adhäsionskaskade

Der Ablauf der Migration in lymphatisches Gewebe wurde bereits ausführlich beschrieben [von Andrian und Mackay, 2000; von Andrian und Mempel, 2003]. Im Rahmen der Extravasation binden die Lymphozyten mit einem Selektin, bspw. CD62L, in den PLN an dessen endothelialen Liganden PNAd bzw. in den PP an MAdCAM-1, wodurch ein Rollen der Lymphozyten entlang des Endothels ausgelöst wird (**Abbildung 1.2-A** und **Abbildung 1.2-B**). In den PP ist für effizientes Rollen zusätzlich eine Bindung von $\alpha 4\beta 7$ an MAdCAM-1 erforderlich [Bargatze et al., 1995]. Durch diesen Kontakt und die daraus resultierende Flussverlangsamung wird eine Bindung zwischen zellulären Chemokinrezeptoren wie CCR7 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7) und den löslichen Chemokinen CCL19/21 (CC-Motiv-Chemokin-Ligand 19/21) ermöglicht (**Abbildung 1.2-C**). Dieser Vorgang führt zur Aktivierung von Lymphozyten-Integrinen und somit einer starken Bindung an das Endothel [Stein et al., 2000] (**Abbildung 1.2-D**). Die anschließende Transmigration (**Abbildung 1.2-E**) kann parazellulär oder transzellulär erfolgen und beinhaltet komplexe Interaktionen, die Gegenstand intensiver Forschung sind [Muller, 2013].

Diese Adhäsionskaskade wurde bereits ausführlich für T-Lymphozyten beschrieben, gilt jedoch auch für B-Lymphozyten. Lediglich die Lokalisierung innerhalb der HEV, sowie die beteiligten Chemokine und deren Rezeptoren können sich beim *Homing* der B-Lymphozyten unterscheiden [von Andrian und Mackay, 2000; Warnock et al., 2000].

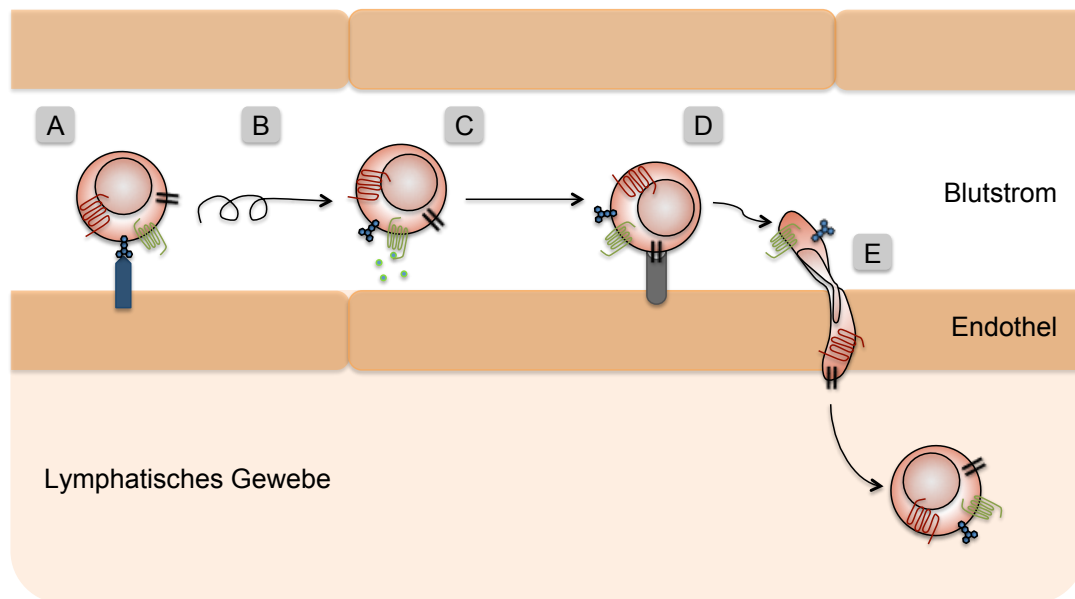


Abbildung 1.2: Schematischer Ablauf der Migration in SLO. (A) Lymphozyten binden in HEV von PLN mit CD62L an dessen endothelialen Liganden PNAd bzw. in PP auch an MAdCAM-1. (B) Rollen und Flussverlangsamung. (C) Bindung von Chemokinen. (D) Aktivierung von Integrinen (LFA-1 in PLN bzw. $\alpha_4\beta_7$ in PP) und starke Bindung an deren endothelialen Liganden (ICAM-1 in PLN bzw. MAdCAM-1 in PP). (E) Transmigration in SLO. Abbildung modifiziert [von Andrian und Mackay, 2000; von Andrian und Mempel, 2003].

1.1.2.2 Rezirkulation der Lymphozyten

Wenn sich B- oder T-Zellen einige Stunden ohne Antigenkontakt in einem SLO aufgehalten haben, verlassen sie dieses, um zur Detektion von Antigenen bzw. potentiellen Pathogenen weiter durch andere lymphatische Organe zu patrouillieren oder in peripheres Gewebe einzuwandern. Der Ausstrom aus der Milz erfolgt ins Blut, aus Lymphknoten oder den PP zunächst in die Lymphbahnen [Cyster und Schwab, 2012]. Eine zentrale Rolle für den Ausstrom von Lymphozyten aus SLO spielt die chemotaktische Migration in Richtung des Phospholipids Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1P₁) bindet [Matloubian et al., 2004]. Hinsichtlich primärer lymphatischer Organe ist auch der Ausstrom von T-Lymphozyten aus dem Thymus stark abhängig von S1P und S1P₁ [Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004]. Der Ausstrom von B-Zellen aus dem Knochenmark scheint ebenfalls hierdurch reguliert zu werden, jedoch weniger ausgeprägt [Allende et al., 2010; Matloubian et al., 2004].

Den schematischen Ablauf der S1P-vermittelten Rezirkulation der Lymphozyten zeigt **Abbildung 1.3**. S1P ist primär ein intrazellulärer Metabolit, der während der Membransynthese anfällt [Cyster und Schwab, 2012]. Als Ligand für die membrangebundenen S1P-Rezeptoren agiert jedoch nur extrazelluläres S1P, das von Endothelzellen der Lymphbahnen [Pham et al., 2010] bzw. im Plasma von Erythrozyten synthetisiert wird [Pappu et al., 2007]. Voraussetzung für die Chemotaxis und somit den Ausstrom aus lymphatischem Gewebe ist ein suffizienter Gradient zwischen parenchymatösem und intravaskulärem S1P [Schwab et al., 2005]. Die S1P₁-exprimierenden Lymphozyten folgen diesem Gradienten und verlassen so das lymphatische Gewebe. Die dort herrschenden hohen Konzentrationen von S1P führen über die Bindung an den S1P₁ zu dessen Internalisierung und somit einer gewissen Desensibilisierung, sobald die Lymphozyten den Blutstrom bzw. die Lymphbahn erreicht haben [Lo et al., 2005]. Je nach Aufenthaltsort der Lymphozyten kann also ligandenabhängig eine entsprechend starke bzw. schwache Expression des S1P₁ beobachtet werden (**Abbildung 1.3**).

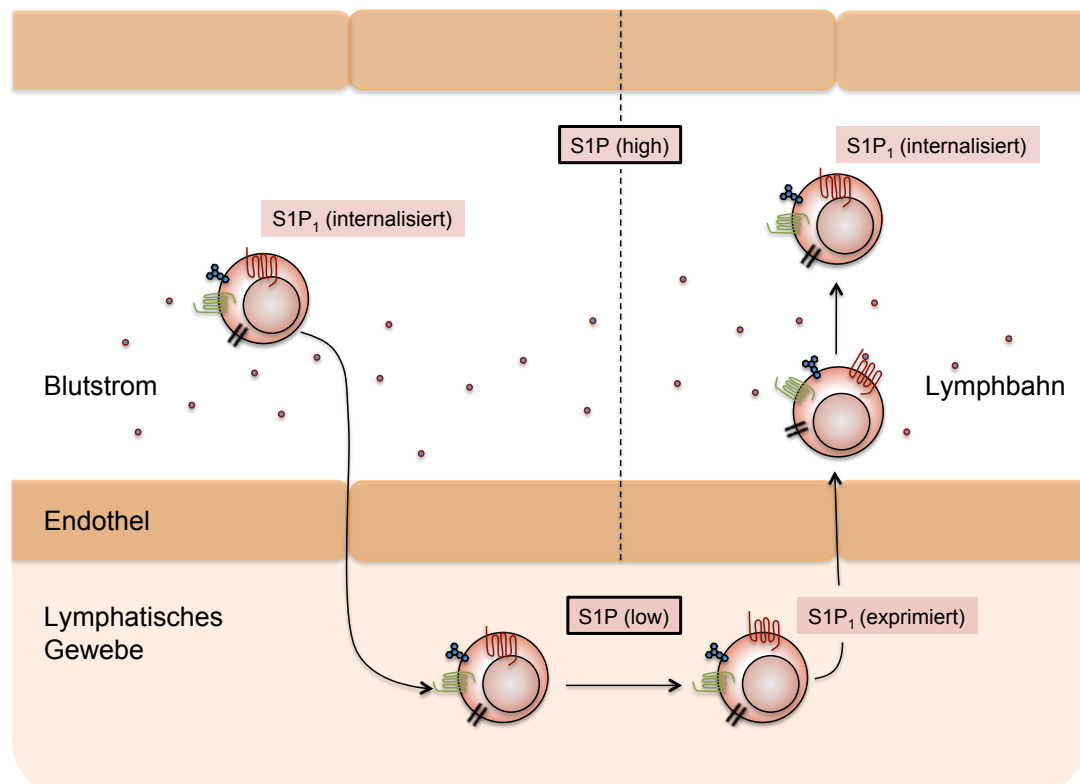


Abbildung 1.3: Der Zyklus der S1P₁-Expression und die S1P-vermittelte Rezirkulation der Lymphozyten. Lymphozyten in S1P-reichem Blut internalisieren S1P₁. Die Migration in SLO erfolgt entsprechend der Adhäsionskaskade (siehe 1.1.2.1). Im S1P-armen lymphatischen Parenchym erfolgt die Re-Expression von S1P₁. Die Lymphozyten verlassen nun das Gewebe entlang des S1P-Gradienten. In der S1P-reichen Lymphe erfolgt wiederum eine Internalisierung des S1P₁. Abbildung modifiziert [Lo et al., 2005].

In der frühen Phase einer primären Immunantwort bspw. im Rahmen einer viralen Infektion kann dieser Mechanismus jedoch posttranslational durch die assoziierte Aktivierung der Lymphozyten behindert werden. Der Aktivitätsmarker CD69 bildet einen Komplex mit dem S1P₁, bewirkt dessen Internalisierung und Degradierung und behindert so den durch Chemotaxis vermittelten Ausstrom der Lymphozyten [Shiow et al., 2006]. Etwas später erfolgt diese Regulation auch auf Transkriptionsebene. So ist der S1P₁ auf mRNA-Ebene ca. drei Stunden (h) bzw. einen Tag nach Aktivierung von B- oder T-Lymphozyten signifikant herunterreguliert [Cinamon et al., 2004; Matloubian et al., 2004]. Als Gegenspieler des S1P-Systems agiert CCR7 und vermittelt vermehrte Retention und verminderten Ausstrom von Lymphozyten aus lymphatischem Gewebe [Pham et al., 2008], wodurch eine verlängerte und somit optimierte Interaktion zwischen Lymphozyten und DCs ermöglicht wird.

1.1.3 Immunreaktion bei systemischer Virusinfektion

1.1.3.1 Erkennung von Erregern durch Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems

Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Mit seinen zellulären und humoralen Bestandteilen stellt das angeborene Immunsystem die erste Instanz der Immunabwehr gegen eindringende Erreger dar. *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) stellen eine Gruppe der sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) des angeborenen Immunsystems dar, die konservierte mikrobielle Strukturen erkennen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) [Janeway und Medzhitov, 2002; Kumar et al., 2009; Medzhitov und Janeway, 1997]. Je nach Rezeptor werden entsprechende Signalwege des angeborenen Immunsystems und somit spezielle Transkriptionsfaktoren aktiviert [Kawai und Akira, 2010], welche die konsekutive Induktion einer inflammatorischen und adaptiven Immunantwort bewirken [Browne, 2012; Iwasaki und Medzhitov, 2010].

Bekannt sind eine Reihe von TLRs, die charakteristische PAMPs von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen sowie synthetische Analoga erkennen können. Dies können u.a. Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrat- oder Lipidgruppen sein, die nicht Bestandteil körpereigener Zellen sind (Tabelle 1). Die Expression der einzelnen TLRs erfolgt Spezies-abhängig. Für den Menschen sind 10 TLRs bekannt (TLR1-10), für die Maus 12 (TLR1-9, TLR11-13) [Takeda und Akira, 2007]. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in der Endosomen-Membran lokalisiert, wohingegen die übrigen TLRs auf der Zelloberfläche

exprimiert werden [Kumar et al., 2009, 2011].

TLR	Liganden (Beispiele)	Referenz
TLR1/2	Triacyllipopeptide (PAM ₃ CSK ₄) Lipoproteine ((Myko-)Bakterien)	[Takeuchi et al., 2002]
TLR2	Peptidoglykan (grampositive Bakterien) Zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	[Schwandner et al., 1999] [Underhill et al., 1999]
TLR3	dsRNA (Reoviren) Poly(I:C)	[Alexopoulou et al., 2001]
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS) (gramnegative Bakterien) Fusionsproteine (Viren) Hitzeschockproteine (zelleigene)	[Poltorak et al., 1998] [Hoshino et al., 1999] [Kurt-Jones et al., 2000] [Ohashi et al., 2000]
TLR5	Flagellin (<i>Salmonella typhimurium</i>)	[Hayashi et al., 2001]
TLR6/2	Diacyllipopeptide (Mykoplasmen)	[Takeuchi et al., 2001]
TLR7	ssRNA (VSV, Influenza) Imidazoquinoline (R848)	[Heil et al., 2004] [Lund et al., 2004] [Hemmi et al., 2002]
TLR8	ssRNA, Imidazoquinoline (R848)	[Heil et al., 2004]
TLR9	Unmethylierte CpG-Motive (Bakterien, Viren) dsDNA (<i>Herpes-simplex-Virus</i>)	[Hemmi et al., 2000] [Lund et al., 2003]
TLR10	<i>Listeria monocytogenes</i> (Ligand unbekannt)	[Regan et al., 2013]
TLR11	Uropathogene Bakterien (<i>Escherichia coli</i>) Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)	[Zhang et al., 2004] [Yarovinsky et al., 2005]
TLR12	Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)	[Koblansky et al., 2013]
TLR13	23S rRNA (<i>Staphylococcus aureus</i>)	[Oldenburg et al., 2012]

Tabelle 1: Toll-like-Rezeptoren und ihre spezifischen Liganden. CpG: Cytosin-(phosphat)-Guanin-Oligonukleotid. dsRNA: *double stranded RNA*. Poly(I:C): *polyinosinic-polycytidylic acid*. rRNA: ribosomale RNA. ssRNA: *single stranded RNA*. VSV: *Vesicular Stomatitis Virus*. Tabelle modifiziert [Kumar et al., 2011].

Bedeutsam für die Erkennung viraler PAMPs sind vor allem die intrazellulären, endosomal lokalisierten Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 [Barton, 2007]. Da bei der Bildung von Viruspartikeln wirtseigene Zellbestandteile verwendet werden, eignen sich diese nicht zur Unterscheidung von „Eigen“ und „Fremd“. Daher spielen virale Nukleinsäuren eine zentrale Rolle bei der Erkennung virusinfizierter Zellen [M. R. Thompson et al., 2011]. Der für die vorliegende Arbeit wichtige Rezeptor TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (*double stranded RNA*, dsRNA), welche in eukaryotischen Zellen nicht vorkommt, und das synthetische dsRNA-Analogon *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly(I:C)), welches eine Virusinfektion simulieren kann. Der Ligand für TLR7 und TLR8 ist einzelsträngige RNA (*single stranded RNA*, ssRNA), für TLR9 unmethylierte CpG-Motiv reiche und doppelsträngige DNA (*double stranded DNA*, dsDNA) [Arpaia und Barton, 2011] (siehe auch Tabelle 1).

RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs)

Neben den TLR existieren weitere PRRs des angeborenen Immunsystems, die virale Nukleinsäuren erkennen und eine antivirale Immunantwort induzieren [A. J. Thompson und Locarnini, 2007; M. R. Thompson et al., 2011]. Zu den *retinoic acid inducible gene I-like-Rezeptoren* (RIG-I-like-Rezeptoren, RLRs) gehören RIG-I, *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP-2) [M. R. Thompson et al., 2011]. Diese sind zytoplasmatische Rezeptoren, welche die RNA verschiedener replizierender Viren vor allem in der frühen Phase einer Infektion erkennen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferonen (Typ-I-IFN) induzieren [Kato et al., 2011]. Hierbei spielt die Länge der RNA eine Rolle. Längere RNA oder langkettiges poly(I:C) werden eher von MDA-5 erkannt, wohingegen RIG-I kurzkettige Moleküle bindet [Kato et al., 2008]. Zudem scheinen RIG-I und MDA-5 für die Erkennung jeweils unterschiedlicher RNA-Viren zuständig zu sein [Kato et al., 2006].

1.1.3.2 Zytokinproduktion im Rahmen einer antiviralen Immunantwort

Die entscheidende Folge der Aktivierung von PRRs durch virale PAMPs ist die konsekutive Induktion einer antiviralen Immunantwort in Form der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren am Ort der Infektion mit systemischer Wirkung [López und Hermesh, 2011]. Entscheidend vor allem für eine frühe antivirale Immunantwort und eine suffiziente Kontrolle der Infektion ist

jedoch die Produktion der Typ-I-IFN Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β) [Müller et al., 1994]. Die Erstbeschreibung erfolgte 1957 durch Isaacs und Lindenmann, die bei der Infektion von Hühnereizellen mit dem Influenzavirus die Produktion eines Faktors beobachteten, der mit dem Wachstum und der Ausbreitung des Virus „interferierte“ [George et al., 2012; Isaacs und Lindenmann, 1957]. Quelle dieser Zytokine sind vor allem *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) [Gilliet et al., 2008; Siegal et al., 1999], besonders in der frühen Phase einer Immunantwort [Swiecki et al., 2010]. Jedoch sind auch andere Zellen des Immunsystems und infizierte nicht-hämatologische Zellen fähig zur Produktion von Typ-I-IFN [López und Hermesh, 2011]. Die Typ-I-IFN wirken über den gemeinsamen IFN- α/β -Rezeptor (IFNAR) parakrin auf andere Zellen, können jedoch auch autokrin auf die produzierende Zelle selbst wirken [Pestka et al., 1987]. Die Rezeptorbindung führt über eine Signalkaskade zur Transkription einer Vielzahl sogenannter IFN-stimulierter Gene, die eine antivirale Antwort herbeiführen [Samuel, 2001]. Dies führt zu einer lokalen Hemmung der Virusreplikation und -ausbreitung und äußert sich in systemischen Symptomen wie Müdigkeit, Myalgien, Kopfschmerzen oder Fieber [Dinarello, 1999; López und Hermesh, 2011].

1.1.3.3 Einfluss auf Reifung und Verteilung verschiedener Zelltypen des Immunsystems

Neben dieser direkten antiviralen Wirkung ermöglichen Typ-I-IFN die Aktivierung und Rekrutierung peripherer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zum Ort der Infektion. So konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Typ-I-IFN dazu führt, dass ruhende hämatopoietische Stammzellen des Knochenmarks in den Zellzyklus eintreten [Essers et al., 2009]. Verschiedene Typen humaner DCs zeigen nach Aktivierung durch Typ-I-IFN eine verstärkte antivirale Immunantwort [Phipps-Yonas et al., 2008]. Weiterhin wurde beschrieben, dass Leukozyten des Knochenmarks im Rahmen einer pulmonalen Virusinfektion aktiviert und anschließend in die Lunge rekrutiert werden, wo sie eine vermehrte Resistenz gegenüber verschiedenen Viren beweisen [Hermesh et al., 2010]. Auch bei der Entstehung einer adaptiven Immunantwort spielen Typ-I-IFN eine Rolle. So werden T- und B-Zellen zunächst systemisch Typ-I-IFN-abhängig aktiviert. Durch diese generalisierte Aktivierung ist einerseits eine effektivere antivirale Antwort denkbar. Andererseits wird jedoch möglicherweise durch die zuvor erfolgte unspezifische Aktivierung die Bildung einer Antigen-abhängigen adaptiven Immunantwort erleichtert und gefördert [Alsharifi et al., 2005]. Neben ihrer aktivierenden und proliferativen Wirkung beeinflussen Typ-I-IFN jedoch auch das Zellwachstum und -überleben durch ihre Fähigkeit zur Induktion von Apoptose [Clemens, 2003]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass virusassoziierte IFN- α -Ausschüttung zu einer Involution des Thymus führt [Anz et al.,

2009]. SLO betreffend, konnte für Haut-drainierende PLN gezeigt werden, dass ebenfalls IFN- α -abhängig der Ausstrom der Lymphozyten vermindert wird und Lymphozyten in den entsprechenden Lymphknoten akkumulieren [Shiow et al., 2006]. Hinsichtlich intestinaler SLO haben Vorarbeiten unserer Gruppe gezeigt, dass Immuntherapie von Mäusen mit dem TLR3-, RIG-I- und MDA-5-Liganden poly(I:C) Auswirkungen auf die Zellularität der PP hat. So konnte beobachtet werden, dass die PP der behandelten Tiere innerhalb kurzer Zeit sowohl makroskopisch in der Anzahl vermindert waren, als auch mikroskopisch eine geringere Zellularität aufwiesen. Die Haut-drainierenden PLN hingegen zeigten keine Veränderungen bzw. sogar eine leicht erhöhte Zellularität. Derselbe Phänotyp konnte durch eine systemische Infektion mit dem ssRNA-Virus *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) hervorgerufen werden, sowie durch systemische Applikation von rekombinantem IFN- α . Zusammenfassend trat der vorliegende Phänotyp also nach virusassoziiert Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf. Des Weiteren zeigte sich durch Versuche an IFNAR-defizienten (IFNAR^{-/-})-Mäusen, dass der Effekt streng abhängig von Typ-I-IFN auftritt. Hervorgerufen wurde der Phänotyp maßgeblich durch eine Veränderung der Anzahl von B-Lymphozyten [Heidegger et al., 2013a].

1.2 Fragestellung

Während einer Infektionsreaktion ist die adäquate Positionierung von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems in den einzelnen Immunkompartimenten und Geweben von entscheidender Bedeutung für die Entstehung einer effizienten Immunabwehr. Ebenso kann eine fehlerhafte Rezirkulation von Lymphozyten zur Entstehung von gewebespezifischen Erkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen führen. Nach ihrer Reifung in den primären lymphatischen Organen zirkulieren naive Lymphozyten durch sekundäre lymphatische Organe (SLO), um spezifische Antigene und somit potenzielle Pathogene zu detektieren. Diese Rezirkulation mit zielgerichtetem Einwandern in spezialisierte SLO erfolgt je nach Gewebetyp durch die sequenzielle Interaktion verschiedener lymphozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle. Die Migration in die Peyer-Plaques als wichtiges SLO des Gastrointestinaltrakts wird vor allem durch das Integrin $\alpha_4\beta_7$ vermittelt, die Einwanderung in periphere Lymphknoten (PLN) hingegen u.a. durch das Selektin CD62L.

Die Reifung sowie Verteilung der Lymphozyten in primären und sekundären lymphatischen Organen kann durch virusassoziierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems beeinflusst werden. So führt die Freisetzung von Typ-I-Interferon während einer systemischen Virusinfektion oder nach Applikation synthetischer Nukleinsäuren wie poly(I:C) bei Mäusen zu einer spezifischen numerischen Atrophie der Peyer-Plaques, nicht jedoch anderer SLO wie etwa den PLN. Dieser makroskopische Effekt entsteht vor allem durch eine verminderte Anzahl von B-Lymphozyten. Vor dem Hintergrund der Bedeutung viraler Infektionen im klinischen Alltag und der therapeutischen Nutzung von Immunstimulanzien wie poly(I:C) oder Typ-I-IFN sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- (1) Welche Mechanismen führen zum beobachteten Phänotyp der atrophien Peyer-Plaques nach einer virusassoziierten Aktivierung des angeborenen Immunsystems (siehe **Abbildung 1.4**) ?
- (A) Welche Rolle spielen hierbei Änderungen in der Proliferation und Apoptose von B-Lymphozyten?
- (B) Welche Rolle spielt hierbei die zielgerichtete Rezirkulation von B-Lymphozyten?
- (2) Bestehen hinsichtlich dieser genannten Mechanismen gewebespezifische Unterschiede zwischen PLN und Peyer-Plaques?
- (3) Handelt es sich hierbei um eine permanente Veränderung in der Architektur der lymphatischen Organe oder um ein transientes Phänomen?

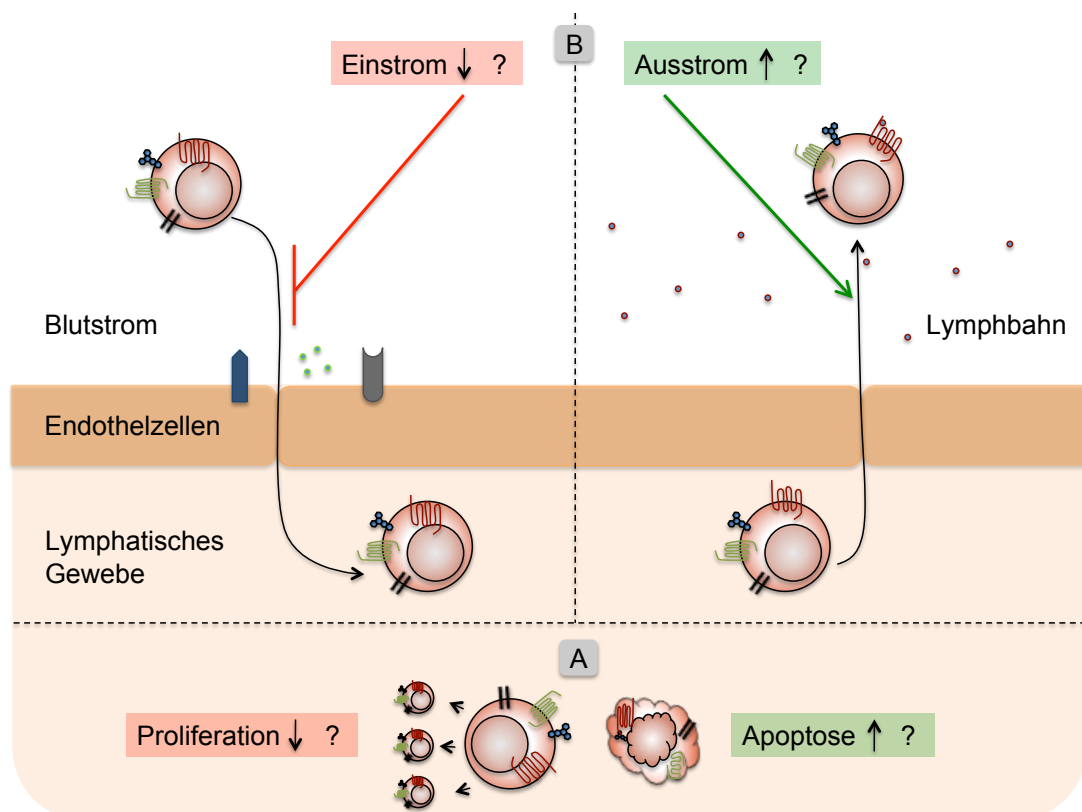


Abbildung 1.4: Mögliche Mechanismen der Atrophie lymphatisches Gewebes. (A) Verminderte Proliferation bzw. gesteigerte Apoptose. (B) Veränderte Migration der Lymphozyten: verminderter Einstrom bzw. vermehrter Ausstrom.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausstattung

Aciovert 25, Primo Vert (Mikroskope)	Zeiss (Göttingen)
BD FACSCanto II (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (San Jose, USA)
Gelproduktion-, Gelelektrophorese- und Blotting-Systeme	Bio-Rad (München)
ImageQuant LAS 4000 mini (Imaging System)	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
LightCycler 480 II (RT-PCR)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Mithras LB 940 (Multilabel Reader)	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Thermomixer	Eppendorf AG (Hamburg)

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand (Wertheim), Becton Dickinson (San Jose, USA), Corning Incorporated (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhäusen), Henke-Sass, Wolf (Tuttlingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.2 Chemikalien, Zellkulturmaterialien und andere Reagenzien

Chemikalien

Acrylamide Rotiphorese Gel 30	Carl Roth (Karlsruhe)
<i>Ammonium persulfate</i> (APS)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Aqua ad iniectionem	Braun AG (Melsungen)
β -Glycerophosphat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe) Sigma Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe)

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Ethanol (70% vergällt)	Apotheke Innenstadt LMU (München)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich (Steinheim)
FACS Flow, FACS Clean	BD Biosciences (San Jose, USA)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycine	Sigma Aldrich (Steinheim)
Hydrochlorid (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Isofluran (Forene)	Abbott (Wiesbaden)
Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse)	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Baxter (Unterschleißheim)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Nonylphenoxypolyethoxylethanol-40 (NP-40)	Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich (Steinheim)
TRIS Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinheim)
Tween-20	Sigma Aldrich (Steinheim)

Zellkulturmaterialien

β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Steinheim)
Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) High glucose (4,5 g/l)	PAA (Pasching, Österreich)

DMEM High Glucose w/o Phenol Red	PAA (Pasching, Österreich)
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen (Paisley, Großbritannien)
HEPES Buffer (1 M)	Sigma Aldrich (Steinheim)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, Österreich)
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) 100x	Invitrogen (Paisley, Großbritannien)
OPTI-MEM	Invitrogen (Paisley, Großbritannien)
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA (Pasching, Österreich)
Sodium Pyruvate Solution (100 mM)	PAA (Pasching, Österreich)
Very low endotoxin (VLE) Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom AG (Berlin)

Enzyme und sonstige Reagenzien

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Sigma Aldrich (Steinheim)
cOmplete ULTRA Tablets	Roche (Mannheim)
DC TM Protein Assay Reagent A	Bio-Rad (München)
DC TM Protein Assay Reagent B	Bio-Rad (München)
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma Aldrich (Steinheim)
FTY720	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA)
Kollagenase A	Roche (Mannheim)
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth (Karlsruhe)
Pronase (Protease)	Calbiochem (La Jolla, USA)
Recombinant MAdCAM-1/Fc Chimera	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Sigma Aldrich (Steinheim)

2.1.3 Medien und Puffer

Zellkultur

Splenozyten-Vollmedium:

VLE RPMI 1640

10 Vol% FCS

2 mM L-Glutamin

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Wechselmedium (Kultivierung mit Viren):

DMEM

20 Vol% FCS

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

MACS-Puffer:

PBS

2 mM EDTA

0,5 Vol% BSA

Western-Blot

Lyse-Puffer (10 ml):

150 mM NaCl

25 mM TRIS

0,5% NP-40

0,5 mM DTT

5 µM NaF

5 µM Na₃VO₄

5 µM β-Glycerolphosphat

1 Tablette cOmplete ULTRA

Laemmli-Puffer (6x):

1,2 g SDS

0,06 g Bromphenolblau

4,7 ml Glycerol

1,2 ml TRIS pH 6,8 (0,5 M)

4,1 ml H₂O

0,939 g DTT

Trenngel 12%:

3,4 ml H₂O
4,0 ml Acrylamid
2,5 ml Trenngel-Puffer
0,1 ml APS
0,006 ml TEMED

Sammelgel:

2,26 ml H₂O
0,68 ml Acrylamid
1 ml Sammelgel-Puffer
0,24 ml APS
0,006 ml TEMED

Trenngel-Puffer (4x) / pH 8,5:

600 ml H₂O
182 g TRIS-HCl
4 g SDS
HCl bis pH 8,8

Sammelgel-Puffer (4x) / pH 6,8:

300 ml H₂O
30,25 g TRIS-HCl
2 g SDS
HCl bis pH 6,8
H₂O auf 500 ml auffüllen

Lauf-Puffer (10x) / pH 8,3:

30,28 g TRIS (0,25 M)
144 g Glycine (2 M)
10 g SDS (1%)
H₂O auf 1000 ml auffüllen

Transfer-Puffer / pH 8,0:

3,03 g TRIS (25 mM)
14,27 g Glycine (190 mM)
200 ml Methanol
H₂O auf 1000 ml auffüllen

Wasch-Puffer (10x) / pH 7,8:

261,4 g TRIS-HCl
53,99 g TRIS
876,6 g NaCl
100 ml Tween-20
H₂O auf 10000 ml auffüllen

Blocking-Lösung:

3-5% Trockenmilchpulver in
Waschpuffer

2.1.4 TLR-Liganden, Zytokine und Antikörper

TLR-Liganden

CpG Oligonukleotid 1826 (CpG) 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
Poly(I:C)-LMW	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)

Zytokine

Rekombinantes murines Interferon- α (IFN- α)	PBL Interferon Source (Piscataway, USA)
Rekombinantes murines Interferon- β (IFN- β)	PBL Interferon Source (Piscataway, USA)

Antikörper

LEAF™ <i>purified anti-mouse</i> LPAM-1	Biolegend (Fell)
LEAF™ <i>purified anti-CD62L</i> -Antikörper	Biolegend (Fell)
Anti-S1P ₁ -Antikörper	Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>goat anti-rat</i> IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

2.1.5 Viren

<i>Vesicular Stomatitis Virus</i> (VSV)	PD Dr. med. Oliver Ebert, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
<i>Encephalomyocarditis Virus</i> (EMCV)	Prof. Dr. med. Anne Krug, Institute for Immunology, Biomedical Center Munich

2.1.6 Western-Blot-Zubehör

Chemoluminescent Detection Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Polyvinylidene fluoride (PVDF) Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Super Signal Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Super Signal Western Blot Enhancer	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.7 Primer und Probes

Primer	Eurofin MWG Operon (Ebersberg)
Probes (Roche Universal Probe Library)	Roche (Mannheim)
<u>S1P₁</u> :	
<i>forward primer</i>	5'-CGGTGTAGACCCAGAGTCCT-3'
<i>reverse primer</i>	5'-AGCTTTTCCTTGGCTGGAG-3'
Probe #66	
<u>HPRT</u> :	
<i>forward primer</i>	5'-CCTCCTCAGACCGCTTTTT-3'
<i>reverse primer</i>	5'-AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'
Probe #95	

2.1.8 FACS-Antikörper und intrazelluläre Farbstoffe

<u>Antikörper</u>	<u>Klon</u>	
anti-B220	RA3-682	Biolegend (Fell)
anti-BrdU	Bu20a	Biolegend (Fell)
anti-CD3 ϵ	145-2C11	Biolegend (Fell)
anti-CD4	RM4-5	BD Horizon (San Jose, USA)
anti-CD8a	53-6.7	Biolegend (Fell)
anti-CD19	6D5	Biolegend (Fell)

anti-CD29	HMB1-1	Biolegend (Fell)
anti-CD44	IM7	Biolegend (Fell)
anti-CD49d	R1-2	Biolegend (Fell)
anti-CD62L	MEL-14	Biolegend (Fell)
anti-CD69	H1.2F3	Biolegend (Fell)
anti-CD103	2 E 7	Biolegend (Fell)
anti-Integrin β 7	FIB504	Biolegend (Fell)
anti-LPAM-1	DATK32	Biolegend (Fell)
Isotype Control Rat IgG2a, κ	RTK2758	Biolegend (Fell)

Intrazelluläre Farbstoffe

<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> (CFSE) Vybrant Cell Tracer Kit	Molecular Probes (Eugene, USA)
CellTracker Violet BMQC	Molecular Probes (Eugene, USA)
<i>Cell Proliferation Dye</i> eFluor 670 (CPD670)	eBioscience (Frankfurt)
Propidium Iodide Staining Solution	BD Pharmingen (San Diego, USA)

2.1.9 Kits

CD19 Microbeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience (Frankfurt)
LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics (Mannheim)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.10 Software

Adobe Creative Suite 4 (CS4)	Adobe Systems (München)
BD FACS Diva	BD Biosciences (San Diego USA)
Endnote X5	Thomson Reuter (Carlsbad, USA)
FlowJo 8.8.7	Tree Star (Ashland, USA)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office X	Microsoft (Unterschleißheim)

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Versuchstiere

Weibliche C57/BL6 Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Das Alter der Tiere betrug zum Versuchszeitpunkt 5 bis 14 Wochen. Alle Tierversuche fanden unter der Genehmigung der Regierung von Oberbayern statt.

2.2.2 Organentnahme und Erstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Versuchstiere wurden unter Isofluran-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Je nach Zielsetzung des Experiments wurden die Milz, inguinale und axilläre Lymphknoten (PLN) und PP entnommen. Anschließend erfolgte optional eine Vorbehandlung mit Kollagenase (1,0 mg/ml) und DNase (0,05 mg/ml). Durch diese enzymatische Verdauung des Gewebes konnte die Ausbeute an Zellen erhöht werden. Nach Zerkleinerung und 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Organe durch ein Zell-Sieb der Porengröße 40 µm gepresst. Nach 7-minütiger Zentrifugation bei 400 g und 4 °C wurden PLN und PP je nach Versuchsanordnung in PBS oder in Vollmedium resuspendiert. Milzen wurden nach der ersten Zentrifugation mit Erythrozyten-Lyse-Puffer behandelt. Erythrozyten-Reste wurden durch erneute Zentrifugation beseitigt. Anschließend erfolgte die Resuspension in PBS oder Vollmedium.

2.2.3 Poly(I:C)-Behandlung *in vivo*

Die Versuchstiere wurden je nach Versuchsablauf über folgende Zeiträume mit 250 µg poly(I:C) (2,5 mg/ml) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion behandelt: 10 bis 12 Stunden vor *in vitro* Chemotaxis-Assays, 18 Stunden vor adoptiven B-Zell-Transfers, 5 und 2 Tage bzw. 4 und 1 Tag vor Proliferations- und Apoptose-Assays (zweimalige Injektion). Anschließend wurden Milz, PLN und PP der poly(I:C)-behandelten Mäuse und einer unbehandelten Kontrollgruppe entnommen.

2.2.4 *In vivo* BrdU-Proliferations-Assay

BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymin, das von proliferierenden Zellen in neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Die Quantifizierung der so umgesetzten BrdU-Menge gibt Aufschluss über die Proliferation von Zellen. Mäuse wurden 5 und 2 Tage bzw. 4 und 1 Tag vor Analyse mit 250 µg poly(I:C) behandelt. 1 Tag vor Analyse wurde allen Mäusen im Abstand von jeweils 6 Stunden dreimalig 2 mg BrdU i.p. verabreicht. 8 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die Organentnahme (Milz, PLN, PP) und die Herstellung von Einzelzellsuspensionen. Nach der Färbung extrazellulärer Antigene erfolgte die Antikörper-vermittelte Färbung des intrazellulären BrdU (siehe 2.4.3.2) und dessen Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie.

2.2.5 *In vivo* Migrations-Assay: Adoptiver B-Zell-Transfer

Der schematische Versuchsablauf ist in **Abbildung 2.1** dargestellt. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden *in vitro* mit IFN- α stimuliert (siehe 2.3.3) oder mit blockierenden Antikörpern behandelt (siehe 2.3.6). Je 5×10^6 behandelte und unbehandelte Zellen wurden intrazellulär mit CFSE bzw. CPD670 gefärbt (siehe 2.4.3.1), zu gleichen Teilen gemischt und unter Isofluran-Narkose mittels intravenöser (i.v.) Injektion in eine Empfänger-Maus transferiert. Die *Input Ratio* (Verhältnis der beiden Zellpopulationen in der Spritze) wurde anschließend per Durchflusszytometrie verifiziert.

Nach 2,5, 18 oder 48 Stunden erfolgte die Organentnahme (Milz, PLN, PP). Die Frequenz der transferierten Zellen in den entnommenen SLO wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

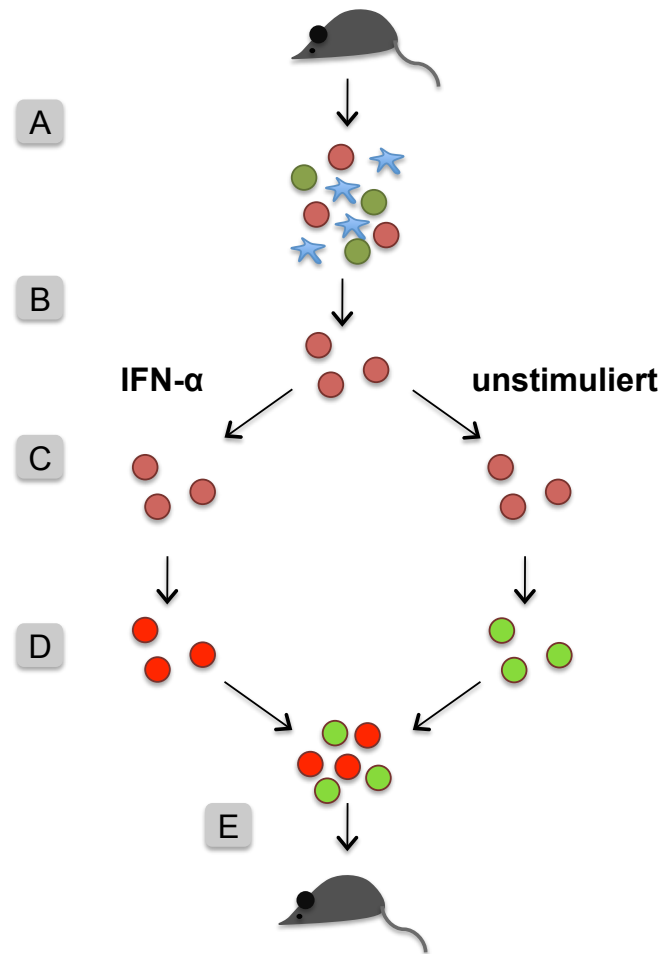


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des adoptiven B-Zell-Transfers nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. (A) Splenozyten wurden aus unbehandelten Spendermäusen entnommen. Es erfolgte (B) die Aufreinigung von B-Lymphozyten. (C) Ein Teil der B-Lymphozyten wurde mit IFN- α stimuliert. (D) Nach 24 Stunden erfolgte die Färbung mit *Cell-Tracking*-Farbstoffen. (E) Zuletzt wurden die unterschiedlich gefärbten B-Lymphozyten gemeinsam in Empfängeräuse transferiert. Die Entnahme von Milz, PLN und PP erfolgte nach 2,5, 18 oder 48 Stunden.

2.2.6 Adoptiver B-Zell-Transfer nach FTY720-Behandlung *in vivo*

Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden teilweise *in vitro* mit IFN- α stimuliert (siehe 2.3.3). Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen in unbehandelte und mit FTY720 behandelte Empfängertiere adoptiv transferiert (siehe 2.2.5). Die behandelten Tiere waren 4 Stunden vor dem Transfer mit 25 μ g FTY720 (Injektion i.p.) behandelt worden. Nach 2,5 Stunden wurden Milz, PLN und PP entnommen und die Frequenz migrierter B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Zellen wurden in geeigneter Verdünnung mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt. Lebende Zellen nehmen aufgrund ihrer intakten Zellmembran keinen Farbstoff auf, tote Zellen hingegen erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Mithilfe eines Lichtmikroskops wurde die vorhandene Gesamt-Zellzahl nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Sichtfeld} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10.000$$

2.3.2 Isolation von CD19⁺ B-Lymphozyten

B-Lymphozyten wurden durch die Methode des *magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert. Hierbei werden Zellen in einem geeigneten Puffer mit spezifischen Antikörpern gegen das Oberflächenmolekül CD19, ein Marker für B-Lymphozyten, inkubiert. Durch eine Kopplung paramagnetischer Mikropartikel an diese Antikörper wurde die Selektion CD19⁺ B-Lymphozyten folgendermaßen ermöglicht: die Antikörper-markierte Zellsuspension wurde in eine Plastik-Säule gegeben, die zuvor in einem äußeren magnetischen Feld platziert wurde. CD19⁺ Zellen verblieben aufgrund der gekoppelten paramagnetischen Antikörper in der Säule, CD19⁻ Zellen passierten die Säule und wurden in einem Auffangbehälter gesammelt. Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld wurden die in der Säule vorhandenen CD19⁺ B-Lymphozyten in ein separates Röhrchen gespült, gezählt und in PBS oder Vollmedium resuspendiert.

2.3.3 *In vitro* Stimulationen mit TLR-Liganden und Zytokinen

In vitro Stimulationen mit TLR-Liganden und Zytokinen wurden in 96-well- bzw. 6-well-Platten durchgeführt. Die Zellkonzentration betrug entsprechend 2×10^6 Zellen/ml bzw. 3×10^6 Zellen/ml. Gesamtsplenozyten und aufgereinigte B-Lymphozyten wurden in Vollmedium mit CpG (5 µg/ml), poly(I:C) (200 µg/ml), rekombinantem IFN- α (10^3 U/ml) oder rekombinantem IFN- β (10^3 U/ml) stimuliert, bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und nach 4 bzw. 24 Stunden zur weiteren Analyse verwendet.

2.3.4 Kultivierung von Splenozyten in der Gegenwart von Viren

Gesamtsplenozyten wurden in 96-*well*-Platten (2×10^6 Zellen/ml) mit verschiedenen Viren in Kultur gegeben. Die Zellen wurden mit dem *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) und dem *Encephalomyocarditis Virus* (EMCV) in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 1 und 10 *plaque forming units* (PFU)/Zelle) zunächst in OPTI-MEM inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Nach 2 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel (Antibiotikum-haltiges Wechselmedium). Nach 24 Stunden wurde die Expression ausgewählter Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.3.5 *In vitro* Chemotaxis-Assay

Gesamtsplenozyten wurden *in vitro* über 12 Stunden mit 200 µg/ml poly(I:C) stimuliert. Alternativ erfolgte eine *in vivo* Behandlung mit 250 µg poly(I:C). Nach 10 bis 12 Stunden wurden Splenozyten und Lymphozyten aus PLN und PP gewonnen.

Der Chemotaxis-Assay wurde in einem *Transwell*-System in 24-*well*-Platten durchgeführt. Die Membranen der *Transwells* verfügten über einen Durchmesser von 6,5 mm und eine Porengröße von 5 µm. Lymphozyten besitzen eine Größe von 6 bis 8 µm, sodass sie ohne chemotaktischen Reiz im oberen Kompartiment des *Transwell*-Systems verbleiben. Werden sie einem chemotaktischen Gradienten ausgesetzt, ist es den Zellen durch Verformung möglich, durch die kleineren Poren zu gelangen und entlang des Gradienten zu wandern (siehe **Abbildung 2.2**).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) wurde in verschiedenen Konzentrationen (0; 1; 10; 100; 1000 nM) in 600 µl FCS-freiem RPMI-Medium in die *wells* gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C äquilibriert. Unstimulierte sowie poly(I:C)-stimulierte Lymphozyten wurden in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml in ebenfalls FCS-freiem RPMI-Medium resuspendiert. Jeweils 1×10^6 Zellen (100 µl) wurden vorsichtig auf die Membran der eingesetzten *Transwells* pipettiert und über 3 Stunden (37 °C, 5% CO₂) dem chemotaktischen S1P-Gradienten ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der migrierten Zellen durch manuelle Zählung mit der Neubauer-Zählkammer. Die Frequenz der B-Lymphozyten vor und nach der Migration wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

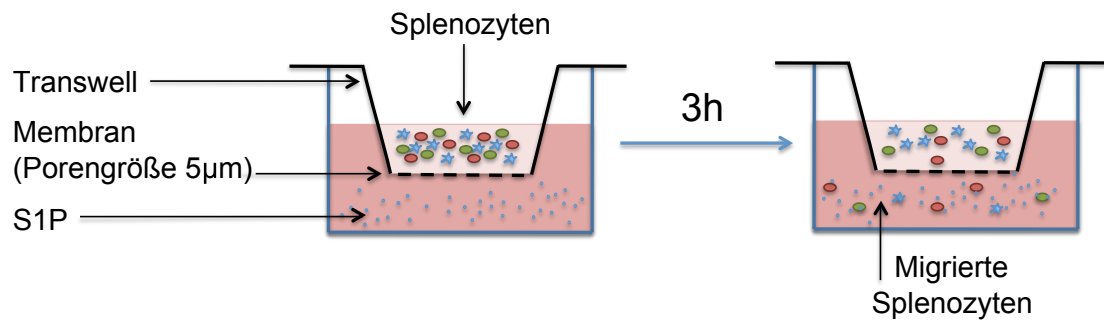


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des *in-vitro* Chemotaxis-Assays am Beispiel von unstimulierten Splenozyten. Splenozyten wurden in die obere Kammer eines *Transwell*-Systems mit der Porengröße 5 µm pipettiert. In der unteren Kammer befand sich S1P. Nach 3 Stunden erfolgte die Quantifizierung der entlang des S1P-Gradienten migrierten Splenozyten.

2.3.6 *In vitro* MAdCAM-1-Adhäsions-Assay

Das Adhäsionsverhalten unbehandelter und stimulierter B-Lymphozyten an MAdCAM-1 wurde mittels eines *in vitro*-Assays untersucht. Hierfür wurde eine spezielle Zellkulturplatte (Greiner CELLSTAR, transparenzgemindertes Gehäuse mit transparentem Deckel) mit 10 µg/ml MAdCAM-1 Fc-Chimera in 100 µl/well über Nacht bei 4 °C bzw. eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) gecoatet. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Platte mit 200 µl 1%-igem BSA geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT konnten die zu untersuchenden Zellen aufgetragen werden. Hierfür wurden stimulierte oder unstimulierte aufgereinigte B-Lymphozyten (siehe 2.3.2) mit CFSE gefärbt (siehe 2.4.3.1) und $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml in DMEM *w/o Phenol Red* und 25 mM HEPES resuspendiert. In der folgenden Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ wurden optional blockierende Antikörper gegen $\alpha_4\beta_7$, CD62L oder LFA-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml hinzugefügt. Anschließend konnten die Zellen auf die vorbereitete Platte aufgetragen werden. Hierfür wurden 500.000 Zellen/well in einem Volumen von 100 µl/well bei 37 °C und 5% CO₂ über 25 Minuten inkubiert. Die anschließende Quantifizierung der adhärenenten Zellen erfolgte nach 3 bis 4 Waschschritten mit PBS mittels Fluoreszenzanalyse und einer Standard-Verdünnungsreihe (siehe **Abbildung 2.3**).

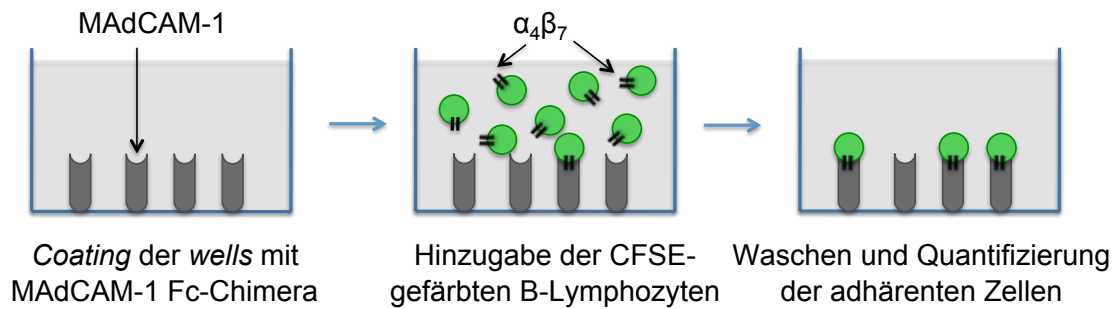


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise des *in vitro* MAdCAM-1-Adhäsions-Assays am Beispiel von unstimulierten B-Lymphozyten. Transparente Zellkulturplatten wurden mit MAdCAM-1 Fc-Chimera gecoatet. Anschließend wurden CFSE-gefärbte B-Lymphozyten hinzugegeben. Zuletzt erfolgte die Quantifizierung der adhärenenten Zellen mittels Fluoreszenzanalyse.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Methodisches Prinzip

Durch das sogenannte *fluorescence activated cell sorting* (FACS, Durchflusszytometrie) können Zellen nach ihrer Morphologie unterschieden und Oberflächenmoleküle anhand Fluorochrom-gekoppelter Antikörper quantifiziert werden. Die schematische Funktionsweise zeigt **Abbildung 2.4**. Zellen passieren in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln eine Kapillare (*flow cell*), in der die Zellen mit Lasern verschiedener Wellenlängen bestrahlt werden. Hierbei können Zellen zum einen durch optische Streuung nach Größe und Granularität unterschieden werden. Das gestreute Licht wird von entsprechenden Detektoren registriert. Die Vorwärtstreuung (*forward scatter*, FSC) ermöglicht die Bestimmung der Größe der Zelle, die Seitwärtstreuung (*side scatter*, SSC) die Granularität. Zudem kann die Expression extra- und intrazellulärer Moleküle mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper quantifiziert werden. In der Kapillare werden die Fluorochrome durch Laser verschiedener Wellenlängen angeregt, woraufhin sie Licht bestimmter Wellenlängen emittieren. Dieses kann durch entsprechende Filter und Detektoren gemessen werden, sodass eine gleichzeitige Analyse mehrerer Fluorochrome bzw. Moleküle möglich ist. Einerseits können so verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen differenziert werden: T-Lymphozyten exprimieren CD3, B-Lymphozyten sind positiv für CD19 oder B220. Andererseits kann, entsprechend der mittleren Intensität der Fluoreszenz (*mean fluorescence intensity*, MFI) die Menge exprimierter Moleküle quantifiziert werden.

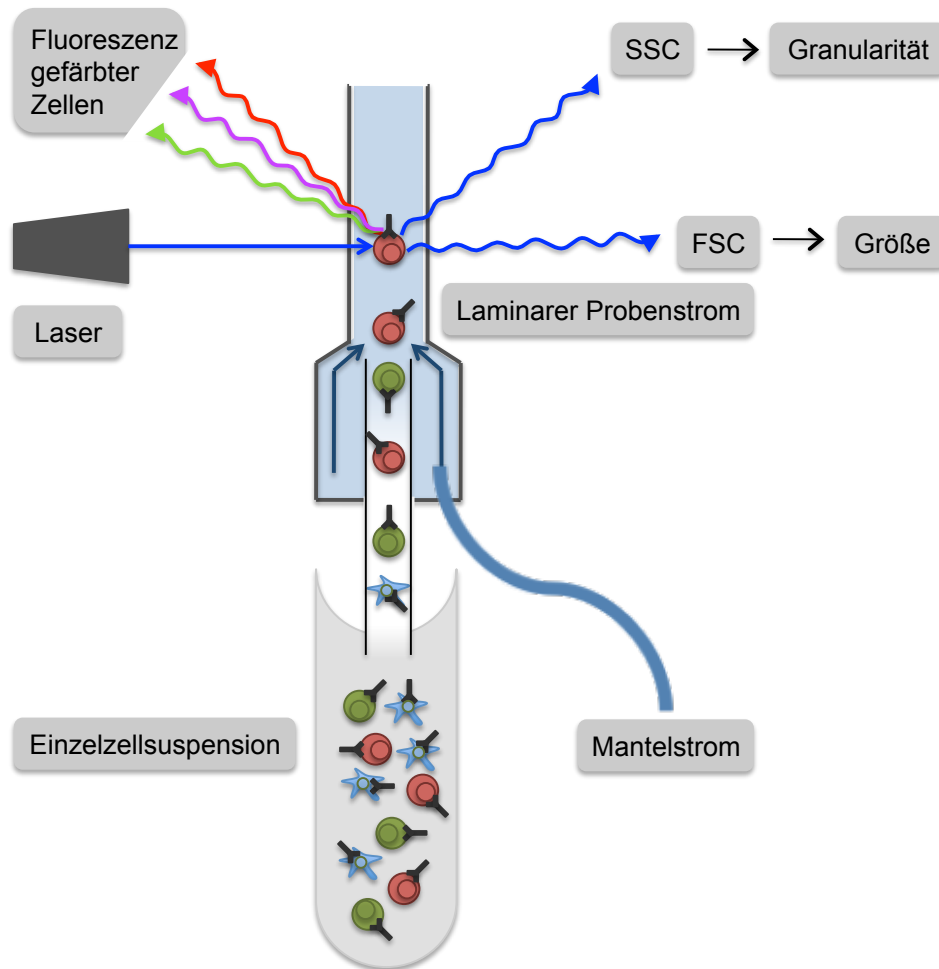


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. Antikörper-markierte Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch eine Kapillare in die Durchflusszelle des Durchflusszytometers gesaugt. Durch den Mantelstrom passieren hier die Zellen laminar den Lichtstrahl eines oder mehrerer Laser. Durch die detektierte Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreuung (FSC bzw. SSC) können Größe bzw. Granularität der Zellen bestimmt werden. Des Weiteren emittieren Fluorochrom-gekoppelte zellulär gebundene Antikörper nach Anregung Licht bestimmter Wellenlängen, sodass eine Differenzierung der Subpopulationen und Quantifizierung von Oberflächenmolekülen möglich ist.

Für die beschriebenen Versuche wurde das Durchflusszytometer FACSCanto II verwendet. Dieses verfügt über drei Laser (Wellenlängen: 405 nm, 488 nm, 635 nm). Verwendete Fluorochrome waren: *Allophycocyanin* (APC), APC-Cy7 (APC gekoppelter Farbstoff), BD *Horizon V500*, *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *Pacific Blue*, R-Phycoerythrin (PE), PE-Cy7 (PE-gekoppelter Farbstoff), *Peridinin-chlorophyll-protein*-Cy5.5 (PerCp-Cy5.5). Tabelle 2 zeigt die jeweils detektierbaren Fluorochrome sowie deren Exzitations- und Emissions-Maxima.

<u>Laser</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Exzitations-Maximum</u>	<u>Emissions-Maximum</u>
405 nm (violett)	Pacific Blue	401 nm	452 nm
	BD Horizon V500	415 nm	500 nm
488 nm (blau)	FITC	494 nm	525 nm
	PE	496 nm	578 nm
	PE-Cy7	496 nm	785 nm
	PerCp-Cy5.5	482 nm	695 nm
635 nm (rot)	APC	650 nm	660 nm
	APC-Cy7	650 nm	785 nm

Tabelle 2: Detektierbare Fluorochrome mit Exzitations- und Emissions-Maxima.

2.4.2 Extrazellulärfärbung

Zur Färbung extrazellulärer, also oberflächlicher Moleküle wurden bis zu $3 \cdot 10^6$ Zellen für 20 Minuten bei 4 °C in 50 µl PBS mit 0,5 µl je Fluorochrom-gekoppeltem Antikörper gegen das entsprechende Antigen inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit PBS wurde die Zellsuspension ebenfalls mit PBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Resuspension und Analyse in PBS.

2.4.3 Intrazellulärfärbung

2.4.3.1 Färbung mit Cell Tracking-Farbstoffen

Durch Farbstoffe wie CFSE oder CPD670, die über kovalente Bindungen unspezifisch an intrazelluläre Proteine binden, können Zellen über längere Zeiträume stabil gefärbt werden, sodass Aussagen über Proliferation oder Migration möglich sind. Hierbei kommt

es nach Aufnahme der inaktiven Form des Farbstoffs in die Zelle zur Spaltung einer Esterbindung, woraufhin der Farbstoff zu fluoreszieren beginnt. Für adoptive Zell-Transfers wurden die zu färbenden Zellen in einer Konzentration von $20 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei 37 °C über 15 Minuten mit 5-10 µM CFSE bzw. über 10 Minuten mit 5-10 µM CPD670 inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 10 ml FCS-haltigem Vollmedium gestoppt und die Zellen wurden für weitere 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Resuspension in PBS für die weitere Verwendung.

2.4.3.2 Intrazelluläre BrdU-Färbung

Für Proliferations-Assays mit BrdU erfolgte nach der Färbung extrazellulärer Antigene die Färbung des intrazellulär inkorporierten BrdU. Alle Zellen wurden zunächst über 30 Minuten bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Dies erfolgte durch den Fixierungs/Permeabilisierungs-Puffer des Kits von eBioscience. Nach zweimaligem Waschen mit einem Permeabilisierungs-Puffer erfolgte die Behandlung der Zellen mit 0,05 mg/ml DNase I über 10 Minuten bei 37 °C und weiteren 25 Minuten bei 4 °C, um das BrdU für die Färbung zugänglicher zu machen. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Färbung mit 20 µl des PE-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper über 20 Minuten bei RT. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

2.4.4 Apoptose-Färbung

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich auch apoptotische und tote Zellen von lebenden Zellen differenzieren. Dies erfolgte durch eine Färbung mit Annexin V und *propidium iodide* (PI). Annexin V bindet in der Gegenwart von Kalzium an Phospholipide, die auf der Oberfläche apoptotischer Zellen exponiert sind und gibt so vor allem Aufschluss über die Anzahl frühapoptotischer Zellen. PI ist nicht membrangängig und wird daher nur von Zellen aufgenommen, die Membrandefekte aufweisen, also von spätapoptotischen und toten Zellen. In der Zelle interkaliert PI in der DNA, wodurch seine Fluoreszenz signifikant verstärkt wird. Zellen, die somit zunächst nur für Annexin positiv sind, befinden sich im früheren Stadium der Apoptose. Können sie zusätzlich mit PI angefärbt werden, spricht dies für Spätapoptose bzw. Zelltod.

Die Zellen wurden zunächst in 150 µl kalziumhaltigem Puffer resuspendiert, der die Annexin-Bindung ermöglichte. Anschließend erfolgte die Färbung mit 3,5 µl Annexin-FITC

und 1 µl PI (detektierbar im PE- und PerCp-Cy5.5-Kanal). Die Frequenz apoptotischer und toter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.5 Protein-Analyse

2.5.1 Extraktion zellulärer Proteine

Zur Gewinnung zellulären Gesamtproteins aus aufgereinigten B-Lymphozyten aus PLN und PP unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Tiere wurden $20 \cdot 10^6$ Zellen zunächst in 80 µl Lyse-Puffer suspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate über 10 Minuten bei 16000 g zur Entfernung von Zellresten zentrifugiert. Die Überstände, die das Gesamtprotein enthielten, wurden zunächst auf ihren Proteingehalt mittels *Bradford-Assay* untersucht. Hierbei wurde nach Hinzugabe eines Reagenziengemischs von BIORAD gemäß Herstellerangaben die Lichtabsorption der Lysate bei 750 nm gemessen und der Proteingehalt mittels einer Standard-Verdünnungsreihe berechnet.

2.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Werden Proteine als polare Substanzen einer elektrischen Spannung ausgesetzt, so kann in diesem elektrischen Feld je nach Größe und Ladung eine entsprechende Wanderung der Proteine beobachtet werden. Als Trennmedium dient hierbei ein Gel auf Acrylamidbasis, in dem je nach Acrylamid-Konzentration entsprechend kleine Proteine leichter wandern als Größere. Wird also ein Proteingemisch auf ein dafür geeignetes Gel aufgetragen und eine gewisse Spannung angelegt, erfolgt die Auftrennung der Proteine je nach Größe und Ladung, sodass anschließend die Zusammensetzung des Proteingemischs bestimmt werden kann.

Hierfür wurden 50 µg des zu untersuchenden Proteingemischs mit der gleichen Menge an Laemmli-Puffer für 10 Minuten bei 98 °C aufgekocht. Anschließend wurden die Proben sowie das Marker-Proteingemisch auf ein dafür gegossenes 12%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel für 90 Minuten bei 50 mA in einem Lauf-Puffer belassen.

2.5.3 Western Blot zur S1P₁-Bestimmung

Die nach der Elektrophorese im Gel befindlichen und aufgetrennten Proteine können durch erneutes Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zum Gel auf eine Membran übertragen (*Blotting*) und immunologisch nachgewiesen werden. Dafür werden zunächst primäre Antikörper gegen das gesuchte Protein auf die Membran aufgetragen. Die gebundenen Antikörper werden anschließend mit einem sekundären Antikörper markiert. Dieser wird mittels Chemolumineszenz detektiert, wodurch das Protein quantifiziert werden kann.

Das *Blotting* wurde in einem Transfer-Puffer für 60 Minuten bei 360 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Membran bei RT für eine Stunde in 3-5%-iger Milch geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran für 2 Stunden mit 0,5 mg/ml primärem Antikörper gegen S1P₁ in Wasch-Puffer mit 1% BSA und 0,05% Natrium-Azid. Nach dreimaligem Waschen über jeweils 10 Minuten erfolgte die Inkubation für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper, der in 3-5%-iger Milch im Verhältnis 1:2000 verdünnt wurde. Die S1P₁-Menge der Proben konnte nach erneutem Waschen mittels Chemolumineszenz bestimmt werden. Als Referenzprotein diente hierbei β -Actin, das als Strukturprotein ubiquitär und konstitutiv exprimiert wird.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolation zytoplasmatischer RNA

Um die Genexpression von S1P₁ nach poly(I:C)-Stimulation zu ermitteln, wurde RNA aus aufgereinigten B-Lymphozyten aus PLN und PP unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Tiere gewonnen. Die Organentnahme erfolgte hier 6 bzw. 24 Stunden nach poly(I:C)-Behandlung.

Die Isolation erfolgte nach dem TRIzol-Protokoll (Invitrogen) des Herstellers. Die aufgereinigten B-Zellen wurden zunächst in 1 ml TRIzol/10⁷ Zellen lysiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei RT wurden 200 μ l Chloroform hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln über 15 Sekunden und weiteren 2 bis 3 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation mit 12000 g über 15 Minuten bei 4 °C. Nach Abnahme der obersten wässrigen RNA-reichen Phase wurde die RNA durch Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol über 10 Minuten bei RT ausgefällt. Die ausgefällte RNA wurde bei

12000 g über 20 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen und erneut über 5 Minuten bei 7400 g und 4 °C abzentrifugiert. Die extrahierte RNA wurde in 20 µl sterilem, RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 Minuten bei 55-60 °C erhitzt. Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Reverse Transkription

Die extrahierte RNA wurde zunächst mit Hilfe des *first strand cDNA synthesis kit* (Thermo Scientific) in eine Einzelstrang *copy*-DNA (cDNA) umgewandelt. Gemäß den Herstellerangaben wurden folgende Reagenzien verwendet: 5x *Reaction Buffer*, dNTP Mix (jeweils 10 mM), RevertAid™ *Reverse Transcriptase*, RiboLock™ *RNase Inhibitor*, Oligo(dT)₁₈ Primer. 1 µg der extrahierten RNA wurde mit 8 µl des Reagenzien-Gemischs vermischt und steriles Nuklease-freies Wasser für ein Endvolumen von 20 µl hinzugefügt. Der Abschrieb erfolgte für 60 Minuten bei 42 °C und wurde für 5 Minuten bei 4 °C beendet. Die gewonnene cDNA wurde bis zur folgenden qRT-PCR bei -80 °C gelagert.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.3.1 Methodisches Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung kleinster DNA-Sequenzen. Die Amplifikation erfolgt durch das wiederholte Durchlaufen eines Zyklus', der folgende Schritte beinhaltet:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA, um 2. ein Anlagern von Primern an das gesuchte Gen der nun einzelsträngigen DNA zu ermöglichen. 3. Amplifikation durch eine thermostabile DNA-Polymerase mittels hinzugegebener Nukleotide.

Neben der Ursprungs-DNA werden die neu synthetisierten DNA-Stränge im nächsten Zyklus ebenfalls amplifiziert. Auf diese Weise erfolgt die Vervielfältigung einer gewünschten DNA-Sequenz, die anschließend auf unterschiedliche Weise genutzt werden kann.

2.6.3.2 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*) stellt eine Sonderform der PCR dar, die zusätzlich zur Amplifikation von DNA deren Quantifizierung in Echtzeit ermöglicht. Dies geschieht mit Hilfe spezieller Fluoreszenz-markierter DNA-Sonden. Nach Sequenz-spezifischer Anlagerung an einen DNA-Strang werden diese durch die 5'-3'-Exonukleasen-Aktivität der Polymerase gespalten und verändern damit ihre Fluoreszenzeigenschaften. Durch Messungen dieser Fluoreszenz in der linearen Phase einer Amplifikation, in der sich die Fluoreszenz proportional zur sich verdoppelnden DNA-Menge entwickelt, lässt sich der ursprüngliche DNA-Gehalt der Probe ermitteln. In der anschließenden Plateauphase ist das Reservoir an Primern und Nukleotiden erschöpft, sodass die Polymerase nicht mehr ausgelastet ist.

Hierfür wurden gemäß Herstellerprotokoll 2 µl der zuvor umgeschriebenen cDNA mit 6 µl H₂O, 10 µl *Probes Master*, 0,8 µl *Forward-Primer*, 0,8 µl *Reverse-Primer* und 0,4 µl *Probe* aus der *Roche Universal Probe Library* in eine RT-PCR-Platte gegeben und mit Hilfe des Roche Light Cycler amplifiziert und analysiert. Angelegt wurden jeweils Triplikate mit Primern von S1P₁ und der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT).

HPRT ist ein Enzym im Purinstoffwechsel und wurde als Referenzgen gewählt, da dieses als sogenanntes *housekeeping gene* unabhängig von äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird. Berechnet wurde anschließend die relative cDNA- bzw. mRNA-Menge von S1P₁ im Verhältnis zur HPRT.

2.7 Statistische Analyse

Die Daten der vorliegenden Arbeit werden angegeben als arithmetische Mittel der Einzelwerte \pm *standard error of the mean* (SEM). Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test oder den ungepaarten *Student's t-Test* ermittelt. Statistische Berechnungen und graphisches Design wurden mit der GraphPad-Software (Prism) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird durch Sternchen (*) dargestellt: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Zellumsatz in den Peyer-Plaques und PLN nach poly(I:C)-Behandlung

3.1.1 Einfluss von poly(I:C) auf die Zellularität der Peyer-Plaques und PLN

Virusassoziierte Immunaktivierung mittels poly(I:C) bewirkt MDA-5-abhängig eine Thymusinvolution, wie frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben [Anz et al., 2009]. Auch auf die Zellularität von SLO wie Milz, PP und PLN wirkt sich eine poly(I:C)-Behandlung von Mäusen aus. So war nach zweimaliger Injektion der synthetischen Nukleinsäure in den PP sowohl eine reduzierte absolute Zellzahl an B-Lymphozyten zu beobachten (**Abbildung 3.1-A**), als auch eine verminderte Zahl an B-Zellen pro Lymphfollikel (**Abbildung 3.1-B**). In anderen SLO wie Milz und PLN hingegen waren die Zellzahlen tendenziell gesteigert.

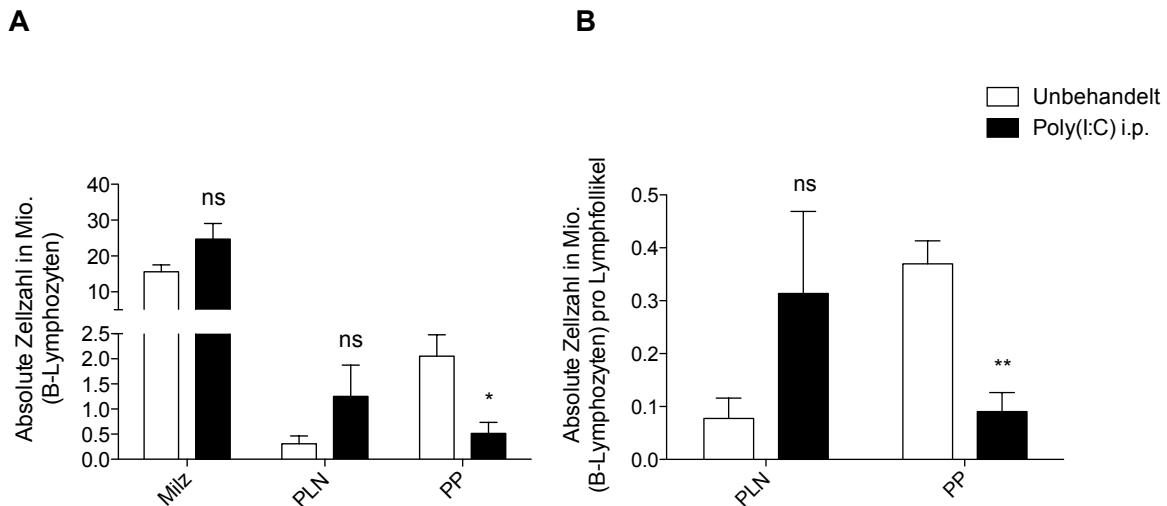


Abbildung 3.1: Absolute Zellzahl (B-Lymphozyten) in Milz, PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. Mäuse wurden wiederholt mit poly(I:C) behandelt (250 µg, Injektion i.p., Tag 0 und 3). 24 Stunden nach der letzten poly(I:C) Injektion erfolgte die Organentnahme (Milz, PLN, PP). (A) Die Berechnung der absoluten Zellzahlen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer, die Ermittlung der B-Zell-Frequenz mittels Durchflusszytometrie. (B) Anschließend wurde die absolute Zellzahl (B-Lymphozyten) je präpariertem Lymphfollikel errechnet. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von vier individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den ungepaarten *Student's t-Test* ermittelt.

3.1.2 Einfluss von poly(I:C) auf die B-Zell Proliferation in den Peyer-Plaques und PLN

Die poly(I:C)-induzierte Thymusinvolution wird durch verminderte Proliferation und gesteigerte Apoptose der Thymozyten, also Vorläuferzellen der T-Lymphozyten, verursacht [Anz et al., 2009]. Um zu ermitteln, ob diese Mechanismen für den vorliegenden Phänotyp und somit für B-Lymphozyten ebenfalls eine Rolle spielen, wurde zunächst mittels eines BrdU-*in vivo*-Assays die Proliferation in der Milz, den PLN und PP unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Mäuse 24 bzw. 48 Stunden nach der letzten Injektion untersucht. Hierbei zeigte sich, dass poly(I:C) weder die Proliferation in den PLN noch in den PP signifikant beeinflusst, jedoch die systemische Immunstimulation eine deutlich gesteigerte Proliferation in der Milz hervorruft (**Abbildung 3.2**).

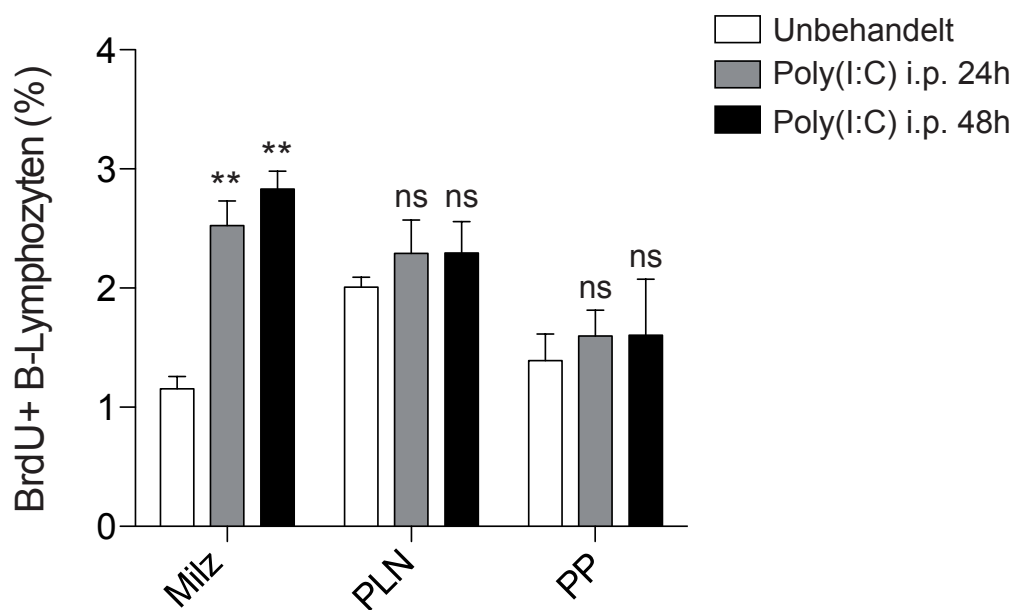
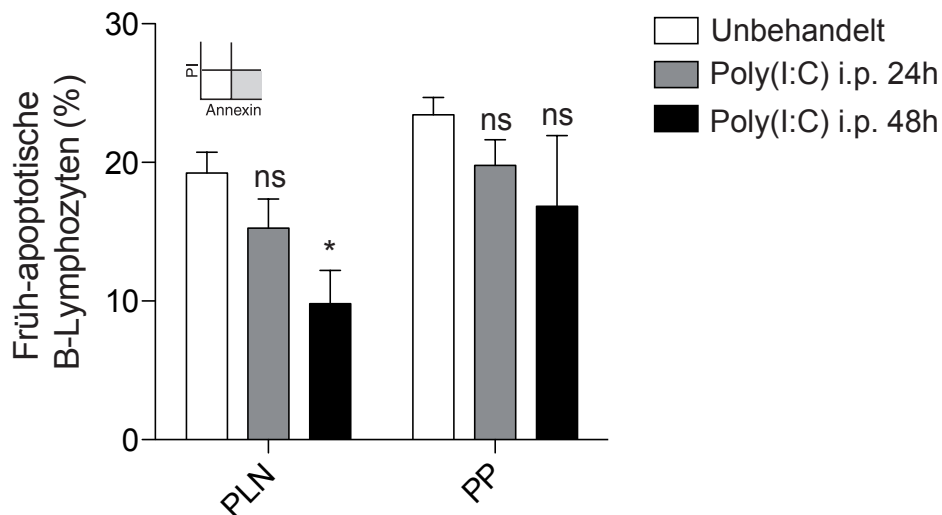


Abbildung 3.2: Proliferation in Milz, PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. Mäuse wurden wiederholt mit poly(I:C) behandelt (250 µg, Injektion i.p., Tag 0 und 3). 24 Stunden (grauer Balken) bzw. 48 Stunden (schwarzer Balken) nach der letzten poly(I:C) Injektion erfolgte die Organentnahme (Milz, PLN, PP) und die Ermittlung der Proliferation mittels intrazellulärer BrdU-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von vier individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.1.3 Einfluss von poly(I:C) auf die B-Zell Apoptose-Rate in den Peyer-Plaques und PLN

Da eine weitere Ursache für den vorliegenden Phänotyp nach poly(I:C)-Behandlung gesteigerte Apoptose in den PP sein könnte (**Abbildung 1.4**), wurden die Apoptose-Raten in der Milz, den PLN und PP unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Mäuse 24 bzw. 48 Stunden nach der letzten Behandlung untersucht. Hierbei zeigten sich bezüglich der Apoptose-Rate von B-Lymphozyten zwar Unterschiede unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Tiere, doch ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PLN und PP nachweisen (**Abbildung 3.3**). Die Rate früh-apoptotischer Zellen (Annexin⁺, PI⁻), zeigte nach poly(I:C)-Behandlung tendenziell eine Reduktion, die nach 48 Stunden noch stärker als nach 24 Stunden ausgeprägt war (**Abbildung 3.3-A**). Spät-apoptotische B-Lymphozyten (Annexin⁺, PI⁺), waren innerhalb der Organe konstant und lediglich in den PP 48 Stunden nach poly(I:C)-Behandlung leicht vermehrt, sodass diese nur milde Erhöhung die makroskopisch sichtbare starke Atrophie nach poly(I:C)-Behandlung nicht ausreichend erklären kann (**Abbildung 3.3-B**).

A



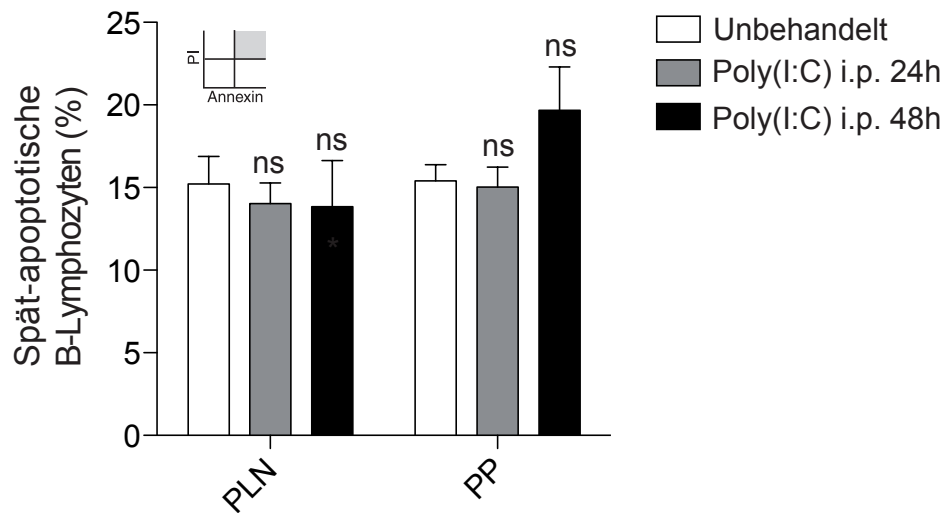
B

Abbildung 3.3: Apoptose-Raten in PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. Mäuse wurden mit poly(I:C) behandelt (250 µg, Injektion i.p., Tag 0 und 3). 24 Stunden (grauer Balken) bzw. 48 Stunden (schwarzer Balken) nach der letzten Injektion erfolgte die Entnahme von PLN und PP und die Ermittlung der Rate (A) frühapoptotischer bzw. (B) spätapoptotischer Zellen mittels einer Annexin/PI-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von vier individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.2 Die Regulation des Ausstroms von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen durch poly(I:C)

Für die Atrophie der PP nach poly(I:C)-Behandlung ist neben reduzierter Proliferation und gesteigerter Apoptose ein verstärkter Ausstrom von Lymphozyten ein weiterer möglicher Mechanismus (**Abbildung 1.4**). Dieser Ausstrom wird u.a. durch S1P und den S1P₁ vermittelt (siehe 1.1.2.2). Durch das Molekül FTY720, ein S1P-Analogon, kann dieser Vorgang pharmakologisch gehemmt werden. FTY720 bindet den S1P₁-Rezeptor, führt zu dessen Internalisierung und Degradierung und bewirkt so eine Retention der Lymphozyten in den lymphatischen Organen [Graler und Goetzl, 2004; Mandala et al., 2002]. FTY720 (auch bekannt als Fingolimod) wird aufgrund dieser immunmodulatorischen Wirkungsweise vor allem in der Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt, um eine verstärkte Retention der Lymphozyten in lymphatischen Organen zu erzielen [Singer, 2013].

Ebenso wie die pharmakologische Hemmung des Lymphozyten-Ausstroms gibt es physiologische Vorgänge, die zu verstärkter Retention führen. Wie bereits in 1.1.2.2 beschrieben, führt eine Aktivierung von Lymphozyten mit Hochregulation des Aktivitätsmarkers CD69 zur Komplexbildung, Internalisierung und Degradierung des S1P₁. Die Lymphozyten zeigen daraufhin verminderte Chemotaxis in Richtung von S1P und somit eine verlängerte Retentionszeit in lymphatischen Organen [Shiow et al., 2006].

Beim vorliegenden Phänotyp nach virusassoziierter Immunaktivierung konnte zwar, dem Modell von Shiow et al. entsprechend, eine gesteigerte Zellularität der PLN, nicht jedoch der PP beobachtet werden. Darüber hinaus haben frühere Versuche unserer Gruppe gezeigt, dass die Atrophie der PP nach poly(I:C)-Behandlung durch FTY720-Behandlung inhibiert werden kann [Heidegger et al., 2013a]. Es lag also die Vermutung nahe, dass hierdurch ein evtl. gesteigerter Ausstrom von Lymphozyten aus den PP blockiert wird, bzw. dass der S1P₁-abhängige Ausstrom von Lymphozyten aus den PP auf andere Weise als in den PLN reguliert wird.

3.2.1 Transkriptionelle Regulation von S1P₁ in B-Lymphozyten aus Peyer-Plaques und PLN von poly(I:C)-behandelten Mäusen

Daher wurde zunächst die Expression von S1P₁ in B-Lymphozyten aus PLN und PP unbehandelter und poly(I:C)-behandelter Mäuse auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR bestimmt. 6 bzw. 24 Stunden nach einmaliger Injektion erfolgte die Organentnahme und die Aufreinigung von B-Lymphozyten mittels MACS. Hier war sowohl für PLN als auch für PP bereits nach 6 Stunden eine Herunterregulation zu beobachten, die in den PP nach 24 Stunden sogar noch verstärkt war (**Abbildung 3.4**). Wie die Hochregulation der S1P₁-mRNA in den PLN nach 24 Stunden zu erklären ist, bleibt zu untersuchen.

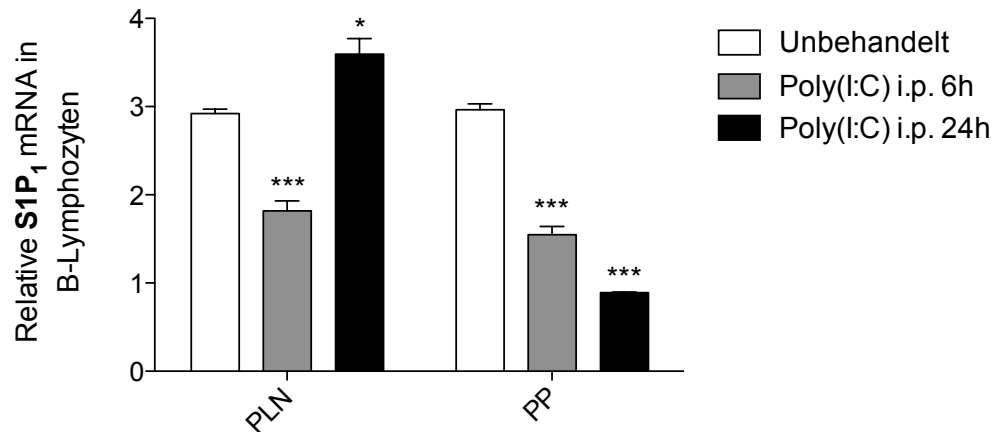


Abbildung 3.4: Relative S1P₁-mRNA-Level von B-Lymphozyten aus PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. Mäuse wurden mit poly(I:C) behandelt (250 µg, Injektion i.p.). 6 Stunden (grauer Balken) bzw. 24 Stunden (schwarzer Balken) nach der letzten Injektion erfolgte die Entnahme von PLN und PP und die Aufreinigung von B-Lymphozyten. Anschließend wurde die S1P₁-Expression auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR ermittelt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von drei individuellen Tieren ± SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.2.2 S1P₁-Expression auf B-Lymphozyten in Peyer-Plaques und PLN von poly(I:C)-behandelten Mäusen

Um zu überprüfen, inwiefern der durch Shio et al. beschriebene Mechanismus und die obigen Ergebnisse auf Regulationen auf Transkriptionsebene beschränkt sind, wurde die Expression von S1P₁ auf Proteinebene untersucht. Die Bestimmung der Proteinlevel erfolgte durch Western Blot und Durchflusszytometrie.

Im Western Blot zeigte sich hierbei passend zu den Ergebnissen der qRT-PCR eine gleichartige Herunterregulation des S1P₁ in den PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo* (**Abbildung 3.5-A**). Nach 6 bzw. 24 Stunden konnten sowohl in den PLN als auch in den PP verminderte Protein-Level von S1P₁ detektiert werden. Die Herunterregulation des S1P₁ wurde mittels einer densitometrischen Analyse und Normierung auf β-Actin bestätigt (**Abbildung 3.5-B**).

Die oberflächliche S1P₁-Expression wurde zudem mittels Durchflusszytometrie untersucht. Auch hier konnte bereits nach 6 Stunden eine Herunterregulation des S1P₁ beobachtet werden (**Abbildung 3.5-C**).

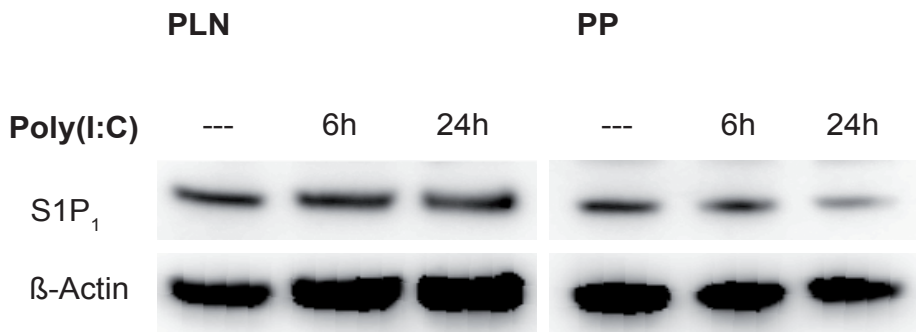
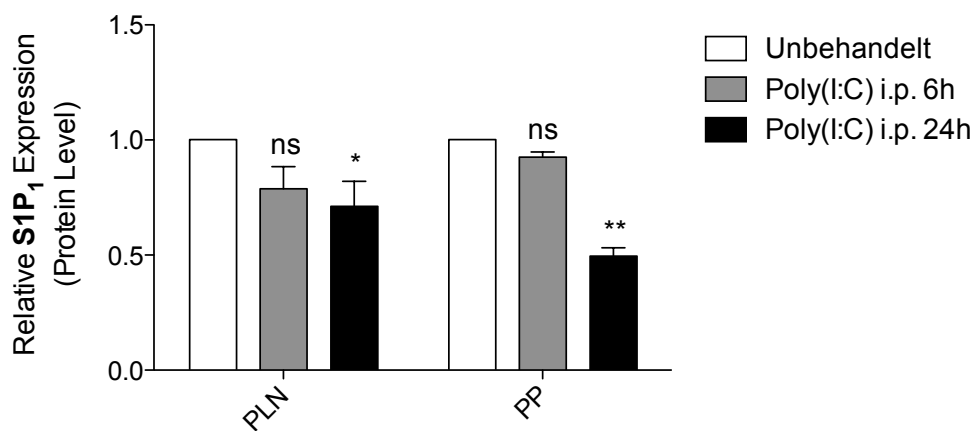
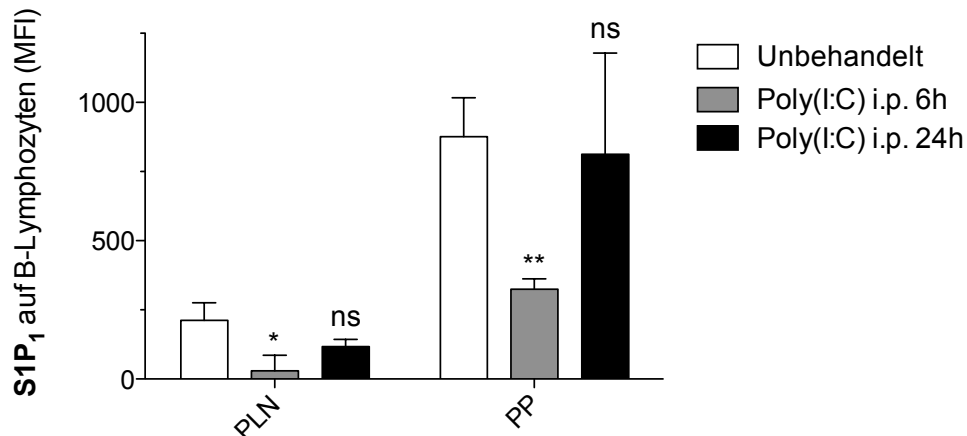
A**B****C**

Abbildung 3.5: S1P₁-Expression auf B-Lymphozyten aus PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo*. Mäuse wurden mit poly(I:C) behandelt (250 µg, Injektion i.p.). 6 Stunden (grauer Balken) bzw. 24 Stunden (schwarzer Balken) nach der letzten Injektion erfolgte die Entnahme von PLN und PP und die Aufreinigung von B-Lymphozyten. (A) Anschließend wurde die gesamte S1P₁-Expression auf Proteinebene mittels Western-Blot ermittelt. (B) In einer densitometrischen Analyse wurde die ermittelte S1P₁-Konzentration auf die ebenfalls ermittelte β-Actin-Konzentration genormt. (C) Die Bestimmung der S1P₁-Expression auf der Zelloberfläche erfolgte zusätzlich mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von drei individuellen Tieren ± SEM und sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test oder den ungepaarten *Student's t*-Test ermittelt.

Bzgl. der Kinetik der S1P₁-Expression in den einzelnen Untersuchungen herrscht eine gewisse Diskrepanz der Daten, jedoch war in allen Untersuchungen, sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene, in einem Zeitraum bis zu 24 Stunden eine verminderte S1P₁-Expression zu beobachten. Diese widerspricht also eher dem postulierten Mechanismus eines verstärkten S1P₁-abhängigen Ausstroms und könnte somit den makroskopisch sichtbaren Effekt atropher PP nicht erklären.

3.2.3 Chemotaxis Richtung S1P von Lymphozyten aus Peyer-Plaques und PLN nach poly(I:C)-Behandlung

Im nächsten Schritt sollte die funktionelle Konsequenz der verminderten S1P₁-Rezeptor Expression auf B-Zellen in PP und PLN nach poly(I:C) Behandlung untersucht werden. Hierfür wurde die S1P-gerichtete Chemotaxis von Splenozyten aus poly(I:C)-behandelten und unbehandelten Mäusen mittels *in vitro*-Assays untersucht. Splenozyten in einem *Transwell*-System wurden über 3 Stunden dem chemotaktischen Reiz verschiedener Konzentrationen von S1P ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der migrierten Zellen. Hierbei zeigten unbehandelte Splenozyten zunächst ein Migrationsmaximum bei einer S1P-Konzentration von 10 nM. Zudem zeigten poly(I:C)-stimulierte B-Lymphozyten der Milz eine stark verminderte gerichtete Chemotaxis im Vergleich zu den Bedingungen ohne S1P (**Abbildung 3.6**).

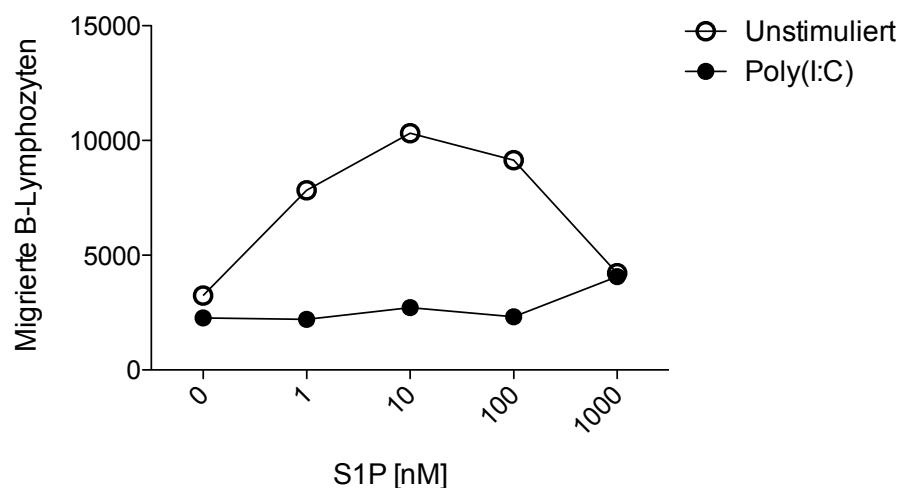
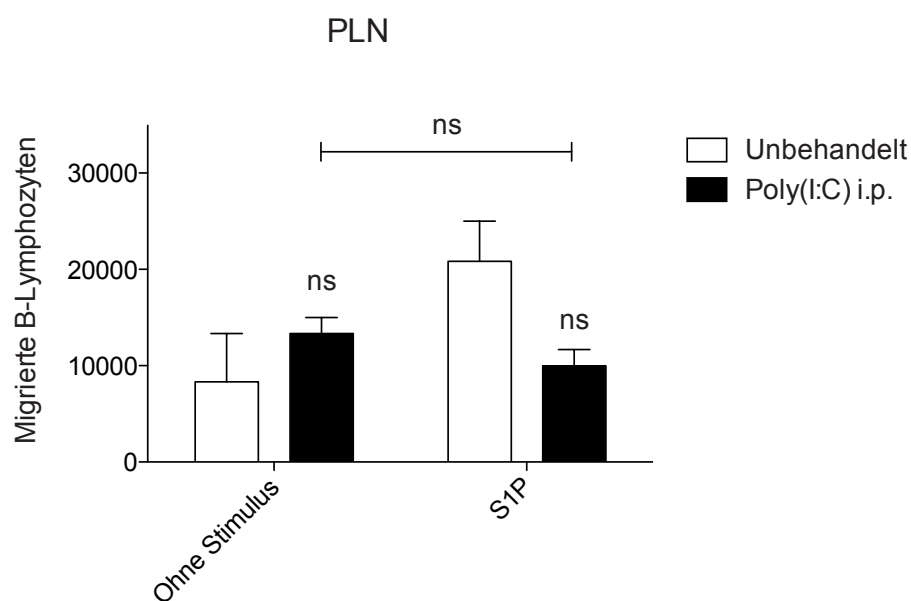


Abbildung 3.6: Chemotaxis von B-Lymphozyten der Milz in Richtung S1P. $1 \cdot 10^6$ unstimulierte bzw. poly(I:C)-stimulierte Gesamtsplenozyten wurden in einem *Transwell*-System verschiedenen Konzentrationen von S1P ausgesetzt (0, 1, 10, 100, 1000 nM) und über 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung der migrierten Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer und die Ermittlung der B-Zell-Frequenz vor und nach der Chemotaxis mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind B-Lymphozyten aus je einem unbehandelten und einem poly(I:C)-behandelten Tier. Die Titrationskurve wurde einmalig zur Dosisfindung von S1P erstellt.

Um zu überprüfen, inwiefern dieser Mechanismus auch auf B-Lymphozyten der PLN und PP zutrifft und ob sich die beiden Organe hinsichtlich dieses Mechanismus unterscheiden, wurde der S1P-Chemotaxis-Assay auch für unstimulierte und poly(I:C)-behandelte Gesamtzellen aus PLN und PP durchgeführt. Hierfür wurde die vorher ermittelte, optimale S1P-Konzentration von 10 nM verwendet.

Die Quantifizierung ergab für Zellen aus den PLN analog zur Milz eine tendenziell verminderte, wenn auch nicht signifikante Transmigration der poly(I:C)-behandelten Lymphozyten. Für Zellen aus den PP setzte sich die verminderte S1P₁-Expression auf Protein- und Transkriptionsebene in einen gleichartigen Effekt um: hier zeigten poly(I:C)-stimulierte Lymphozyten ebenfalls eine verminderte Chemotaxis in Richtung des S1P-Gradienten, noch ausgeprägter als die etwas verringerte Transmigration der Lymphozyten aus den PLN (**Abbildung 3.7**).

Betrachtet man nun die gleichartig verminderte S1P₁-Expression auf Transkriptions- und Proteinebene von B-Lymphozyten aus PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung, sowie die daraus resultierende gleichartig verminderte Chemotaxis in Richtung S1P (wie bereits durch Shio et al. für die PLN beschrieben), erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass ein gesteigerter S1P₁-abhängiger Ausstrom von B-Lymphozyten aus den PP als zugrunde liegender Mechanismus der beobachteten Atrophie nach poly(I:C)-Behandlung in Frage kommt.

A

B

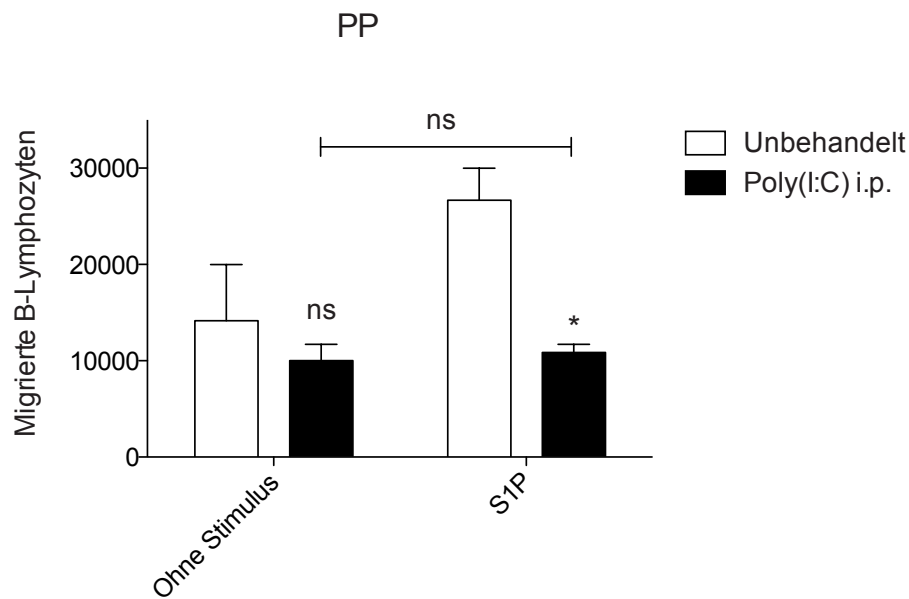


Abbildung 3.7: Chemotaxis von Gesamtzellen aus PLN und PP in Richtung S1P. $1 \cdot 10^6$ unstimulierte bzw. poly(I:C)-stimulierte Zellen aus (A) PLN bzw. (B) PP wurden in einem *Transwell*-System S1P (10 nM) ausgesetzt und über 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung der migrierten Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer. Die Bestimmung der B-Lymphozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von Duplikaten aus je zwei Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den ungepaarten *Student's t*-Test ermittelt.

3.3 Der Einfluss von poly(I:C) und Typ-I-IFN auf die Migration von B-Lymphozyten in die Peyer-Plaques und PLN

3.3.1 Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Stimulation mit Typ-I-IFN *in vitro*

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass FTY720 nicht nur den Ausstrom von Lymphozyten hemmen, sondern auch deren Migration in SLO fördern kann [Henning et al., 2001]. Um der Bedeutung der B-Zell-Migration in PLN und PP bei der Entstehung des beobachteten Phänotyps näherzukommen, wurde zunächst die Expression der *Homing*-Moleküle $\alpha_4\beta_7$ und CD62L nach virusassoziiierter Immunaktivierung untersucht. Vorarbeiten unserer Gruppe mit IFNAR^{-/-}-Mäusen haben gezeigt, dass der Phänotyp nach poly(I:C)-Behandlung durch Typ-I-IFN vermittelt wird [Heidegger et al., 2013a]. Daher wurden Gesamtsplenozyten und aufgereinigte B-Lymphozyten für 24 Stunden mit Kultur-Überständen poly(I:C)-stimulierter Splenozyten, sowie mit rekombinantem IFN- α oder

IFN- β stimuliert, um deren Einfluss auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L zu untersuchen. Als Positivkontrolle wurden Kultur-Überstände CpG-stimulierter Splenozyten verwendet, die vor allem durch IL-6 eine Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ bewirken [Heidegger et al., 2013b].

Auch hier konnte in allen Gruppen eine Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ beobachtet werden. Im Gegensatz dazu bewirkten weder die Kultur-Überstände poly(I:C)-stimulierter Splenozyten, noch rekombinantes IFN- α oder IFN- β eine Veränderung des Expressionslevels von CD62L bzw. führten sogar zu einer Hochregulation (**Abbildung 3.8: aufgereinigte B-Lymphozyten**).

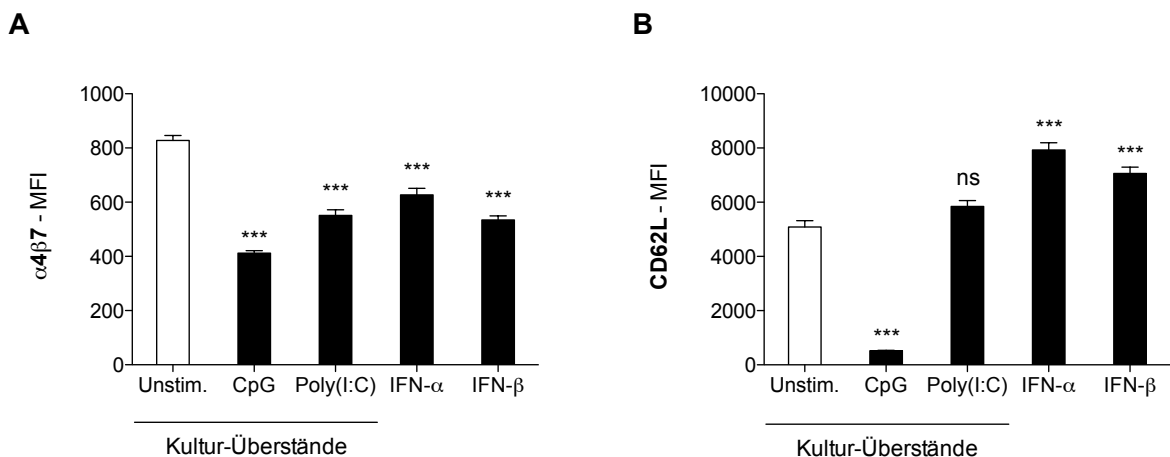


Abbildung 3.8: Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Stimulation mit Typ-I-IFN und Kultur-Überständen poly(I:C)-stimulierter Splenozyten. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden mit Kultur-Überständen unstimulierter, CpG- oder poly(I:C)-stimulierter Splenozyten bzw. rekombinantem IFN- α (10^3 U/ml) oder IFN- β (10^3 U/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Expression von (A) $\alpha_4\beta_7$ und (B) CD62L mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.3.2 Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach *in vitro* Kultivierung in der Gegenwart von Viren

Im Rahmen der weiteren Untersuchung des beobachteten Phänotyps zeigten Versuche unserer Gruppe, dass eine Infektion der Mäuse mit dem VSV den gleichen Phänotyp wie eine poly(I:C)-Behandlung hervorruft: auch hier konnten atrophe PP und in ihrer Zellularität unveränderte PLN beobachtet werden [Heidegger et al., 2013a]. Um zu

untersuchen, welchen Einfluss eine Virusinfektion auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L ausübt, wurden Gesamtsplenozyten für 24 Stunden in der Gegenwart von VSV oder EMCV *in vitro* kultiviert.

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass sowohl $\alpha_4\beta_7$, als auch CD62L auf B-Lymphozyten durch Kultivierung in der Gegenwart von EMCV herunterreguliert wird. Das VSV hingegen hatte keinen Einfluss auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$, bewirkte jedoch eine leichte Hochregulation von CD62L (**Abbildung 3.9**).

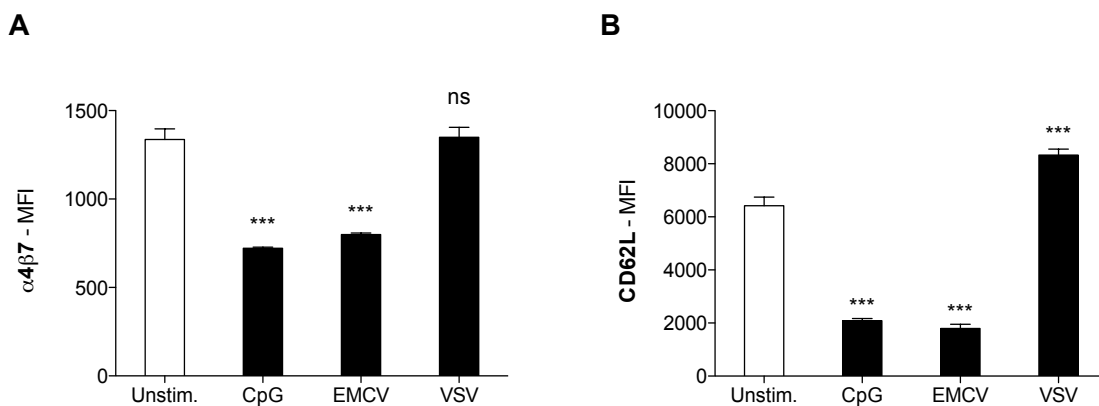


Abbildung 3.9: Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Kultivierung in der Gegenwart von EMCV und VSV. Splenozyten wurden mit CpG (5 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert bzw. in der Gegenwart von EMCV (10 PFU/Zelle) oder VSV (10 PFU/Zelle) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde die Expression von (A) $\alpha_4\beta_7$ und (B) CD62L auf B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.3.3 Adhäsion IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten an MAdCAM-1 *in vitro*

Wie in 3.3.1 beschrieben, führt die *in vitro*-Stimulation von B-Lymphozyten mit rekombinantem IFN- α zu einer Herunterregulation des *Homing*-Moleküls $\alpha_4\beta_7$. CD62L wird durch IFN- α jedoch eher hochreguliert. Zunächst sollte deshalb die funktionelle Konsequenz der veränderten Expression dieser *Homing*-Moleküle überprüft werden. Hierfür wurde *in vitro* die Adhäsion von B-Zellen mittels dieser Moleküle an MAdCAM-1, den endothelialen Liganden von $\alpha_4\beta_7$, untersucht. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden *in vitro* mit IFN- α stimuliert bzw. ein Teil unbehandelt inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entnommen und intrazellulär mit CFSE gefärbt. Ein Teil der unstimulierten Zellen wurde mit blockierenden Antikörpern gegen verschiedene *Homing*-Moleküle

behandelt: anti- $\alpha_4\beta_7$ und anti-CD62L. Anti-LFA-1 diene als Negativkontrolle. Anschließend wurde die *in vitro* Adhäsion an rekombinantes MAdCAM-1 ermittelt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass IFN- α -stimulierte B-Lymphozyten eine deutlich reduzierte Adhäsion an MAdCAM-1 aufweisen. Im Vergleich zu unstimulierten B-Lymphozyten adhärten hier nur ca. 60% der stimulierten Zellen. Diese Frequenz war vergleichbar mit der Zahl der adhärenen Zellen, die zuvor mit einem blockierenden Antikörper gegen $\alpha_4\beta_7$ behandelt wurden. Blockierende Antikörper gegen CD62L und LFA-1 hatten keinen Effekt auf die Adhäsion der behandelten Zellen (**Abbildung 3.10**).

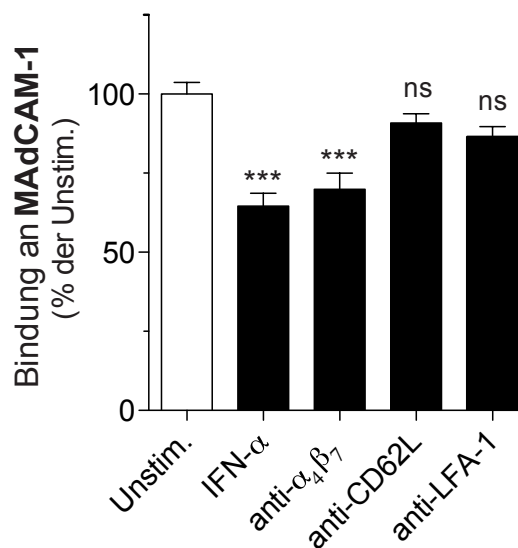


Abbildung 3.10: Adhäsion IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten an MAdCAM-1 *in vitro*. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden für 24 Stunden *in vitro* mit IFN- α stimuliert bzw. nach 24 Stunden mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$, CD62L oder LFA-1 behandelt. Anschließend erfolgte eine Intrazellulärfärbung mit CFSE und die Inkubation in einer mit rekombinanten MAdCAM-1 gecoateten Platte bei 37 °C. Die Zahl der adhärenen Zellen wurde durch einen Multilabel-Reader ermittelt. Die Kontrollgruppe (weißer Balken) erhielt keine Behandlung. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.3.4 Migrationsverhalten IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten *in vivo*

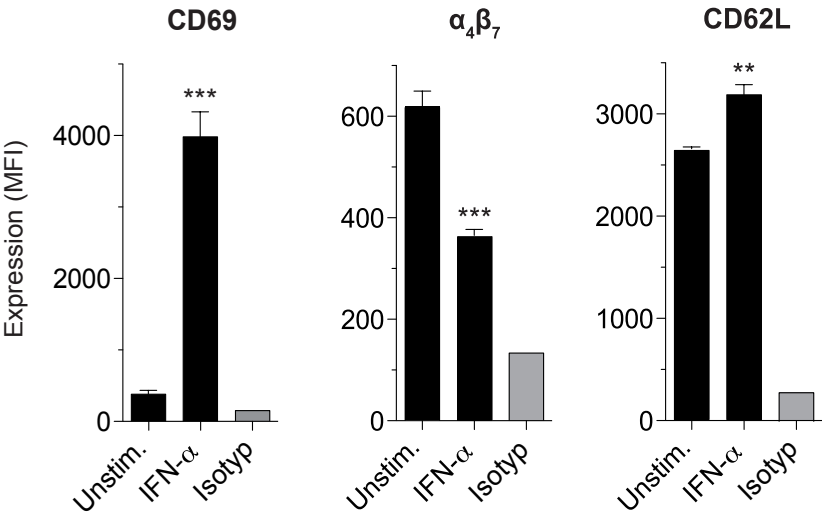
Nachdem wir zeigen konnten, dass Typ-I-IFN eine Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ auf B-Lymphozyten und somit eine verminderte Adhäsion an MAdCAM-1 *in vitro* bewirkt, sollte überprüft werden, inwiefern sich diese verminderte Expression auf den *in vivo*-Migrationsphänotyp auswirkt. Hierzu wurden aufgereinigte B-Lymphozyten *in vitro* mit IFN- α stimuliert bzw. unbehandelt inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Expression von CD69, $\alpha_4\beta_7$ und CD62L ermittelt (**Abbildung 3.11-A**) und die Zellen mit unterschiedlichen *Cell-Tracking*-Farbstoffen intrazellulär gefärbt. Anschließend wurden die beiden Populationen gemischt und in gleichem Verhältnis in unbehandelte Empfängermäuse transferiert (**Abbildung 2.1**). Nach 18 Stunden erfolgte die Analyse von Milz, PLN und PP mittels Durchflusszytometrie (exemplarisch **Abbildung 3.11-B**). Zunächst wurde die Frequenz der transferierten Populationen in den einzelnen Organen bestimmt. Der Quotient aus der Frequenz der stimulierten und unstimulierten transferierten B-Zellen im jeweiligen Organ wurde in Verhältnis zur *Input Ratio* (Verhältnis stimulierter und unstimulierter Zellen in der Spritze) gesetzt; dies ergab den *Homing Index* der transferierten Zellen. Diesen Zusammenhang beschreibt folgende Formel:

$$\text{Homing Index} = \frac{\text{Frequenz stimulierter B-Zellen}}{\text{Frequenz unstimulierter B-Zellen}} \div \text{Input Ratio}$$

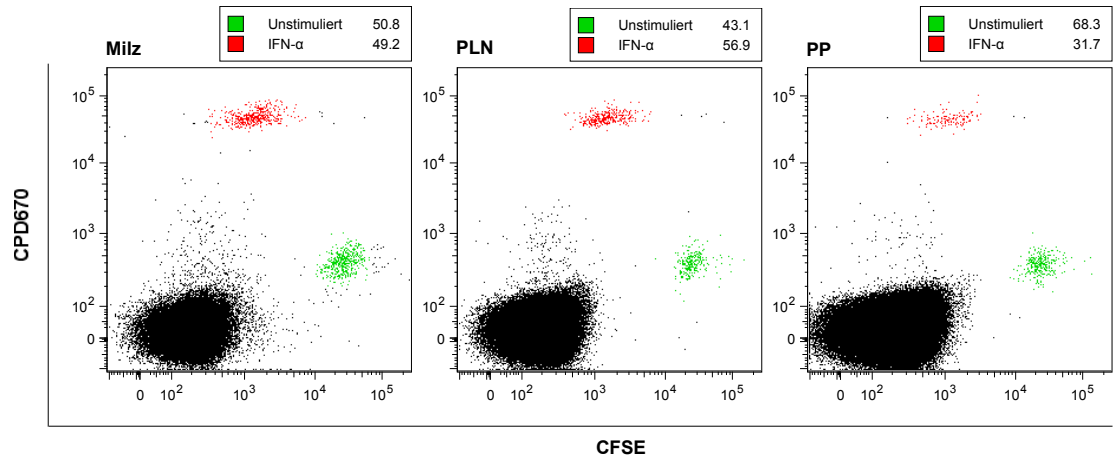
Zuletzt wurde der *Homing Index* der Organe auf den *Homing Index* der Milz genormt. Während die Migration in die Milz durch die Behandlung unbeeinflusst blieb (*Homing Index* = 1), zeigten die IFN- α -stimulierten Lymphozyten ein auf ca. 50% vermindertes *Homing* in die PP. Passend zur Hochregulation von CD62L war die Migration in die PLN jedoch verstärkt (**Abbildung 3.11-C**). Um Einflüsse der Färbung auf das beobachtete Ergebnis auszuschließen, wurden die Versuche auch mit dem jeweils anderen Farbstoff durchgeführt; hier konnte das gleiche Ergebnis erzielt werden.

Betrachtet man den Phänotyp nach poly(I:C)-Behandlung mit stark atrophierten PP und gleichzeitig leicht vergrößerten PLN, so scheint das Migrationsmuster IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten ein guter Anhaltspunkt für eine Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus zu sein.

A



B



C

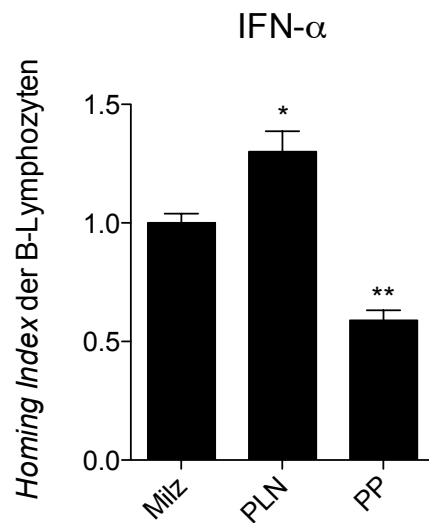


Abbildung 3.11: Homing IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter Mäuse. B-Lymphozyten wurden *in vitro* mit IFN- α stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen intrazellulär gefärbt und $5 \cdot 10^6$ Zellen/Gruppe in unbehandelte Empfängertiere adoptiv transferiert. Nach 18 Stunden wurden Milz, PLN und PP entnommen und die Frequenz migrierter B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. (A) Vor dem adoptiven Transfer wurde die Expression von CD69, $\alpha_4\beta_7$ und CD62L der transferierten Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Fluoreszenzsignale durch unspezifische Bindung wurden mittels einer Isotypen-Kontrolle subtrahiert. (B) Dargestellt sind B-Lymphozyten. Die Zahlenwerte geben jeweils den prozentualen Anteil der gefärbten, transferierten Population innerhalb der migrierten Zellen an (CFSE: unstimuliert, CPD670: IFN- α). (C) Der *Homing Index* wurde aus dem Quotienten stimulierter und unstimulierter transferierter Zellen und der *Input Ratio* gebildet. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von drei individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den ungepaarten *Student's t*-Test oder den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.3.5 Migrationsphänotyp von B-Lymphozyten *in vivo* nach Behandlung mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ und CD62L

In 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von B-Lymphozyten mit IFN- α zu einer verminderten Expression von $\alpha_4\beta_7$, nicht jedoch von CD62L führt. Daraus scheint eine reduzierte Migration in die PP zu resultieren (siehe 3.3.3 und 3.3.4). Es blieb jedoch zunächst unklar, ob der verminderte Einstrom allein auf die Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ zurückgeführt werden kann. Da gewisse Redundanzen in der Funktion zwischen $\alpha_4\beta_7$ und CD62L bestehen und die Rolle von CD62L für das *Homing* in die PP letztlich nicht geklärt ist [Steeber et al., 1998], sollte ein adoptiver Transfer von B-Lymphozyten, die zuvor mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ bzw. CD62L behandelt wurden, Aufschluss geben über die Bedeutung der beiden *Homing*-Moleküle für das B-Zell-*Homing* in PLN bzw. PP.

Während die Migration der Antikörper-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen in die Milz leicht erhöht war, zeigten B-Lymphozyten, die mit einem Antikörper gegen CD62L behandelt worden waren, eine deutlich verminderte Migration in die PLN und leicht reduzierte Migration in die PP. B-Lymphozyten hingegen, die mit einem anti- $\alpha_4\beta_7$ -Antikörper behandelt worden waren, zeigten eine verminderte Migration lediglich in die PP (**Abbildung 3.12**). Eine isolierte Blockade bzw. Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ könnte daher den beobachteten Migrationsphänotyp und makroskopischen Effekt der atrophen PP erklären.

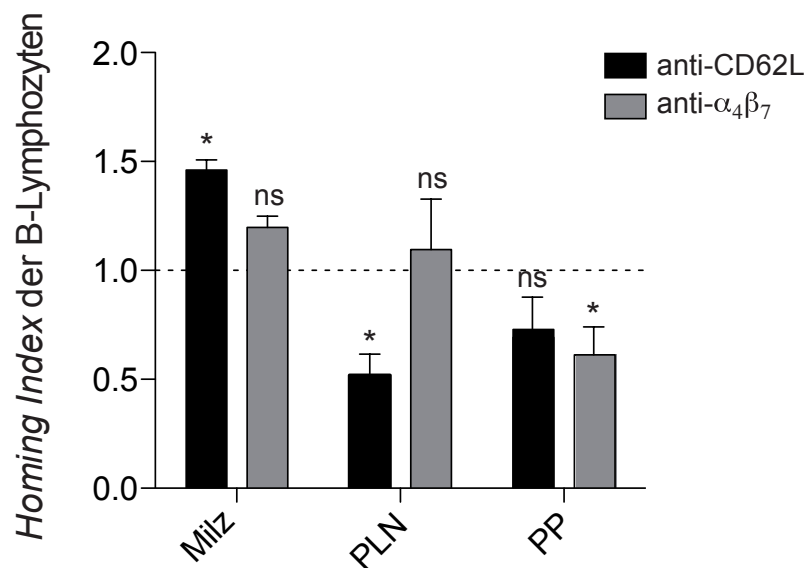


Abbildung 3.12: Homing Antikörper-behandelter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter Mäuse. B-Lymphozyten wurden *in vitro* mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ (graue Balken) und CD62L (schwarze Balken) behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen intrazellulär gefärbt und $5 \cdot 10^6$ Zellen/Gruppe in unbehandelte Empfängertiere adoptiv transferiert. Nach 18 Stunden wurden Milz, PLN und PP entnommen und die Frequenz migrierter B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der *Homing Index* wurde aus dem Quotienten behandelter und unbehandelter transferierter Zellen und der *Input Ratio* gebildet. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von drei individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.3.6 Einfluss von FTY720 auf die *short-term* Migration IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten in die Peyer-Plaques

Wie in 3.2 beschrieben, wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass der Atrophie der PP nach poly(I:C)-Behandlung durch FTY720-Behandlung entgegen gewirkt werden kann. Es wurde zudem bereits beobachtet, dass FTY720 auch die Extravasation von Lymphozyten

unterstützen kann, indem es Zell-Endothel-Interaktionen verstärkt [O. Pabst et al., 2006]. Es sollte nun also untersucht werden, inwiefern FTY720 in unserem Modell die Migration von Lymphozyten in SLO beeinflusst. Hierfür wurden Mäuse mit FTY720 vorbehandelt und nach 4 Stunden unstimulierte und IFN- α -stimulierte B-Lymphozyten adoptiv transferiert. Nach 2,5 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie die Frequenz der transferierten Zellen in der Milz, den PLN und PP bestimmt.

In FTY720-unbehandelten Tieren zeigte sich der bekannte Migrationsphänotyp IFN- α -behandelter Lymphozyten mit leicht erhöhter Migration in die PLN und deutlich vermindertem *Homing* in die PP. In den Tieren, die mit FTY720 vorbehandelt worden waren, konnte eine leicht erhöhte Frequenz in den PLN und deutlich vermehrt transferierte Zellen in den PP beobachtet werden (**Abbildung 3.13**).

Durch die FTY720-Behandlung konnte zwar die Migration in die PP nicht vollkommen wiederhergestellt werden, doch liefern diese Ergebnisse einen Trend bzgl. des Mechanismus von FTY720 bei gleichzeitiger Behandlung mit poly(I:C). So könnte durch die Vorbehandlung der Tiere mit FTY720 die Interaktion des vermindert exprimierten $\alpha_4\beta_7$ und MAdCAM-1 verlängert werden. Hierdurch wäre ein wieder verstärkter Einstrom von B-Lymphozyten denkbar, der die Atrophie nach poly(I:C)-Behandlung verhindert.

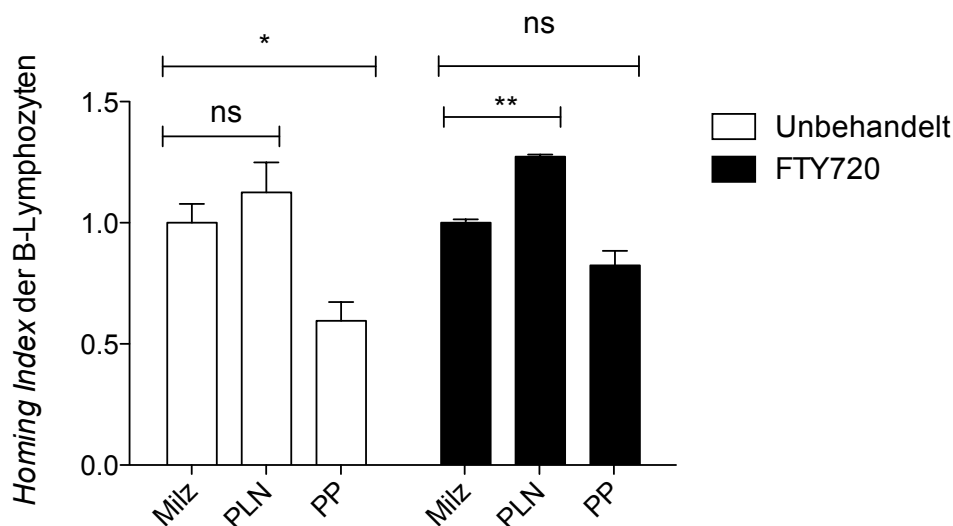


Abbildung 3.13: Homing IFN- α -behandelter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter und FTY720-behandelter Mäuse. B-Lymphozyten wurden *in vitro* mit IFN- α stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen intrazellulär gefärbt und $5 \cdot 10^6$ Zellen/Gruppe in unbehandelte und mit FTY720 behandelte Empfängertiere adoptiv transferiert. Die behandelten Tiere waren 4 Stunden vor dem Transfer mit 25 μ g FTY720 (Injektion i.p.) behandelt worden. Nach 2,5 Stunden wurden Milz, PLN und PP entnommen und die Frequenz migrierter B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der *Homing Index* wurde aus dem Quotienten stimulierter und unstimulierter transferierter Zellen und der *Input Ratio* gebildet. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von je zwei individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

3.4 Zeitlicher Verlauf der Expression von $\alpha_4\beta_7$

Zuletzt sollte überprüft werden, ob es sich bei der verminderten Migration in die PP um einen reversiblen Effekt handelt oder ob die virusassoziierte Immunaktivierung die Zellularität der PP nachhaltig beeinflusst. Vorarbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass 14 bis 21 Tage nach poly(I:C)-Behandlung die Zellularität der PP wieder vollständig hergestellt ist [Heidegger et al., 2013a]. Basierend auf der Annahme, dass die Atrophie der PP durch eine verminderte Migration von B-Lymphozyten verursacht ist, sollte nun der zeitliche Verlauf der $\alpha_4\beta_7$ -Expression untersucht werden. Hierfür wurden die PP 1 Tag und 7 Tage nach poly(I:C)-Behandlung entnommen und mittels Durchflusszytometrie die $\alpha_4\beta_7$ -Expression auf B-Lymphozyten bestimmt. Hierbei zeigte sich 24 Stunden nach poly(I:C)-Behandlung eine starke Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$. Nach 7 Tagen jedoch entsprach die Expression wieder dem Ausgangs-Wert (**Abbildung 3.14**).

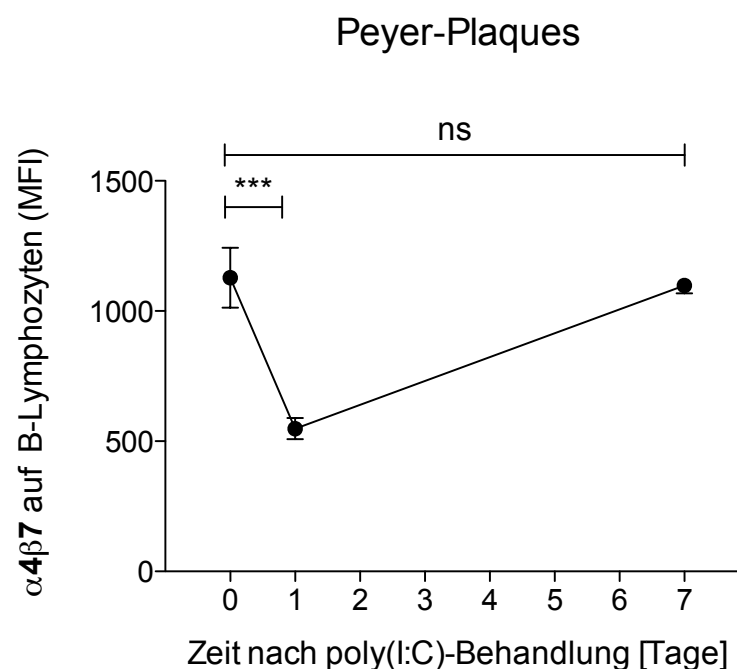


Abbildung 3.14: $\alpha_4\beta_7$ -Expression auf B-Lymphozyten aus PP poly(I:C)-behandelter Mäuse nach 1 und 7 Tagen. Mäuse wurden mit poly(I:C) behandelt (250 μ g, Injektion i.p.). 1 Tag bzw. 7 Tage nach der Injektion erfolgte die Entnahme der PP. Anschließend wurde die $\alpha_4\beta_7$ -Expression auf B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte von drei individuellen Tieren \pm SEM und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde durch den One-way ANOVA-Test ermittelt.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mechanismen untersucht, die eine numerische Atrophie der PP nach virusassoziiert systemischer Immunaktivierung erklären könnten.

4.1.1 Apoptose und Proliferation spielen keine Rolle bei der Entstehung atropher Peyer-Plaques nach poly(I:C)-Behandlung

Es wurde zunächst untersucht, inwiefern die verminderte Zellularität der PP nach virusassoziiert systemischer Immunaktivierung (siehe 3.1.1) durch verstärkte Apoptose oder verminderte Proliferation begründet sei. Diese Mechanismen schienen naheliegend, da es sich beim vorliegenden Phänotypen um ein streng Typ-I-IFN-abhängiges Phänomen handelt. Anti-virale Typ-I-IFN stellen starke Apoptose-Induktoren dar [Clemens, 2003] und inhibieren Proliferation [Sangfelt und Strander, 2001]. So wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass Typ-I-IFN eine Involution des Thymus durch verstärkte Apoptose und verminderte Proliferation der Thymozyten bewirken können [Anz et al., 2009]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre im vorliegenden Fall denkbar gewesen, konnte jedoch nicht beobachtet werden (siehe 3.1).

Es wurde kürzlich festgestellt, dass virale dsRNA TLR3-abhängig die Apoptose intestinaler Epithelzellen (*intestinal epithelial cells*, IEC) der Villi auslöst [McAllister et al., 2013]. Die abgebildeten makroskopischen Veränderungen des Darms zeigen stark distendierte Darmschlingen mit massiver intraluminaler Flüssigkeitsansammlung und ähneln sehr den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit während der Behandlung mit poly(I:C) (Bilder hier nicht gezeigt). Es wurde also vermutlich auch während unserer Behandlung ein gewisser Epithelschaden hervorgerufen. Die Autoren der genannten Studie zeigen weiterhin, dass die induzierte Apoptose nicht die IEC in den Krypten des Dünndarms betrifft. Da sich hier die Stammzellen befinden, aus denen sich neue IEC differenzieren, wurde von den Autoren eine Art Schutzmechanismus postuliert, induziert durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. Auch wenn für diesen Vorgang Typ-I-IFN keine Rolle spielten, stellt die Theorie eines Schutzmechanismus und eines anti-viralen Status der Lymphozyten im vorliegenden Fall einen möglichen Erklärungsansatz für die eher reduzierte Apoptoserate nach 24 Stunden und die

höchstens leicht gesteigerte Apoptoserate nach 48 Stunden dar. Des Weiteren konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Typ-I-IFN das Überleben von B-Lymphozyten steigern und die Apoptoserate senken [Braun et al., 2002].

4.1.2 Der S1P₁-abhängige Ausstrom von Lymphozyten ist nach poly(I:C)-Behandlung in Peyer-Plaques und PLN gleichermaßen verringert

Ein eventuell gesteigerter Ausstrom von Lymphozyten aus den PP bzw. eine gegensätzlich regulierte Retention in PP und PLN wurde anhand der Expression des S1P₁ und der Chemotaxis in Richtung S1P untersucht (siehe 3.2). Analog zu den Beobachtungen von Shiow et al. wurde jedoch nach virusassoziierte Immunaktivierung eine gleichartig verminderte Expression von S1P₁ auf Protein- und Transkriptionsebene in B-Lymphozyten der PP und PLN beobachtet [Shiow et al., 2006]. Auch die Untersuchung der Chemotaxis *ex vivo* nach poly(I:C)-Behandlung zeigte tendenziell eine gleichartig verminderte Migration Richtung S1P durch B-Lymphozyten aus PLN und PP.

Somit legen unsere Daten den Schluss nahe, dass der durch Typ-I-IFN vermittelte verminderte B-Zell Ausstrom und die daraus folgende verlängerte Retention ein Reaktionsmuster verschiedener SLO ist.

Schwierigkeiten im Versuchsablauf bereiteten jedoch grundsätzlich niedrige Zahlen an migrierten B-Lymphozyten, sodass zwar ein Unterschied zwischen B-Lymphozyten aus unbehandelten und poly(I:C)-behandelten Tieren gezeigt werden konnte, sich dieser aber nicht immer als sehr deutlich herausstellte. Jedoch wurde kürzlich beschrieben, dass reife B-Lymphozyten nicht sehr effektiv in Richtung S1P wandern [Allende et al., 2010], wodurch sich die niedrigen Zahlen an migrierten Zellen erklären ließen.

4.1.3 Die Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ führt zu verminderter Migration in die Peyer-Plaques nach virusassoziierte Immunaktivierung

Zuletzt wurde die Beeinflussung der Migration in SLO durch virusassoziierte Immunaktivierung untersucht (siehe 3.3). So konnte nach *in vitro*-Stimulation mit IFN- α zunächst eine Herunterregulation des *Homing*-Moleküls $\alpha_4\beta_7$ beobachtet werden (siehe 3.3.1). In der Vergangenheit wurde durch Morrison et al. ein ähnlicher Effekt auf B-Lymphozyten nach bakterieller Infektion mit *S. typhimurium* bzw. TLR9-Stimulation durch CpG beschrieben. Hier wurde eine signifikant verminderte Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L beobachtet, die ähnlich auch durch poly(I:C) hervorgerufen werden konnte

[Morrison et al., 2010]. In einem adoptiven Transfer-Modell mit IFN- α -stimulierten B-Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit schließlich ein Migrationsphänotyp nachgewiesen werden, der entsprechend der verminderten Expression des *Homing*-Moleküls $\alpha_4\beta_7$ eine reduzierte Migration in die PP aufwies (siehe 3.3.4). Somit liegt die Annahme nahe, dass eine systemische virusassoziierte Immunaktivierung durch eine Regulation des Integrins $\alpha_4\beta_7$ und somit der Migration von B-Lymphozyten zu einer numerischen Atrophie der PP führt.

4.1.3.1 Mögliche zelluläre Mechanismen der Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$

Interessant für die Zukunft wäre die eingehende Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$.

Das Adhäsionsmolekül CD62L betreffend beobachteten Morrison et al. eine verminderte Expression bereits nach 2 bis 4 Stunden, welche von den Autoren auf einen enzymatischen Abbau durch die Metalloprotease ADAM17 zurückgeführt wurde [Morrison et al., 2010]. Bereits nach 24 bis 72 Stunden erfolgte eine vollständige Normalisierung der Expressionslevel. Eine derart deutliche Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch erst nach 24 Stunden beobachtet werden (siehe 3.4). Ein enzymatischer Abbau erscheint aufgrund dieser Kinetik unwahrscheinlich, doch sind sicherlich weitere Untersuchungen mit bspw. unterschiedlichen Protease-Inhibitoren nötig. Viel eher ist jedoch eine transkriptionelle Regulation zu vermuten.

Da es sich bei $\alpha_4\beta_7$ um ein Heterodimer handelt, könnte sowohl eine transkriptionelle Herunterregulation der α_4 - als auch der β_7 -Untereinheit eine verminderte Oberflächenexpression bewirken. Es wurde außerdem gezeigt, dass bei der Bildung von Heterodimeren die Untereinheiten β_7 und β_1 um die Untereinheit α_4 konkurrieren [DeNucci et al., 2010]. Eine vermehrte Transkription von β_1 wäre also ein weiterer denkbarer Mechanismus bei der Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$. Doch auch eine Regulation durch verminderte Transkription von β_7 wäre denkbar. So konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo* mittels RT-PCR verminderte Level an Krüppel-like-Faktor 2 (KLF2) gemessen werden (Daten hier nicht gezeigt). KLF2 ist in B-Lymphozyten ein Transkriptionsfaktor für CD62L und β_7 und wird wie seine Genprodukte u.a. durch B-Zell-Aktivierung herunterreguliert [Carlson et al., 2006; Winkelmann et al., 2011]. Sein Gegenspieler KLF3 wirkt hingegen als transkriptioneller Repressor und somit der Transkription von β_7 entgegen [Alles et al., 2014]. Eine poly(I:C)-induzierte Herunterregulation von KLF2, somit ein relatives Überwiegen der Aktivität des

KLF3 und konsekutiv eine Herunterregulation von β_7 wäre also ebenfalls ein möglicher zellulärer Mechanismus der verminderten Expression von $\alpha_4\beta_7$ nach virusassoziierter Immunaktivierung. Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Expression der einzelnen Untereinheiten und Transkriptionsfaktoren auf Protein- bzw. auf Transkriptionsebene würde möglicherweise weitere Hinweise bzgl. des Mechanismus der Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ liefern.

4.1.3.2 *Virus ist nicht gleich Virus – Kultivierung mit verschiedenen Viren führt zu unterschiedlicher Regulation der Homing-Moleküle*

Vorarbeiten unserer Gruppe zeigten, dass eine systemische Infektion mit VSV zu einem vergleichbaren Phänotyp der SLO führt wie die Applikation von poly(I:C) [Heidegger et al., 2013a]. Eine Kultivierung von Splenozyten in Gegenwart dieses Virus zeigte jedoch keine Wirkung auf $\alpha_4\beta_7$, lediglich eine leicht verstärkte Expression von CD62L. EMCV hingegen bewirkte eine deutliche Herunterregulation beider *Homing*-Moleküle.

Bei EMCV aus der Familie der Picornaviren handelt es sich zwar um ein ssRNA-Virus; dieses produziert jedoch im Laufe der Replikation auch dsRNA und kann so zytosolische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems aktivieren (siehe 1.1.3.1). In diesem Fall ist MDA-5 für eine entsprechende Produktion von Typ-I-IFN und anderen Zytokinen nach *in vitro*-Stimulation zwingend notwendig [Gitlin et al., 2006].

Für VSV, ein ssRNA-Virus aus der Familie der Rhabdoviren wurde hingegen eine strenge Abhängigkeit einer suffizienten IFN- α -Sekretion von TLR7 und MyD88 beschrieben [Lund et al., 2004]. Desweiteren scheint VSV in einer murinen Splenozyten-Kultur v.a. B-Lymphozyten zu aktivieren [Goodman-Snitkoff und McSharry, 1980]. Doch zeigt sich hier eine Diskrepanz zwischen der kaum veränderten Expression der *Homing*-Moleküle nach Kokultivierung von Splenozyten und VSV *in vitro* und dem beschriebenen Phänotyp nach *in vivo*-Infektion von Mäusen. Es müssen komplexe Interaktionen *in vivo* vermutet werden, die *in vitro* so nicht stattfinden und weitere Untersuchungen fordern. Gleichzeitig wäre interessant, ob Viren verschiedener Familien nach *in vivo*-Infektion denselben Phänotypen wie VSV hervorrufen, wenngleich sie *in vitro* unterschiedliche Expressionsmuster von *Homing*-Molekülen bewirken. Da der beobachtete Effekt *in vivo* jedoch streng Typ-I-IFN-abhängig ist, sollte dies für alle Viren gelten, die eine Sekretion von IFN- α induzieren.

4.1.3.3 MAdCAM-1-Adhäsions-Assay und blockierende Antikörper bestätigen den postulierten Mechanismus

Um auszuschließen, dass nach poly(I:C)- bzw. IFN- α -Stimulation andere Effekte als die verminderte Expression von $\alpha_4\beta_7$ für die verminderte Migration in die PP verantwortlich sind, wurde zunächst ein *in vitro*-Adhäsions-Assay mit MAdCAM-1 durchgeführt. Sowohl IFN- α -stimulierte B-Lymphozyten als auch Zellen, die zuvor mit einem Antikörper gegen $\alpha_4\beta_7$ behandelt worden waren, zeigten eine verminderte Adhäsion (siehe 3.3.3). Bemerkenswert war jedoch, dass ein deutlicher Anteil der behandelten Zellen nach wie vor eine Bindung an MAdCAM-1 zeigte. Eine möglicher Grund ist in der Expression von CD62L zu suchen, das ebenfalls – wenn auch nicht so stark wie $\alpha_4\beta_7$ – an MAdCAM-1 binden kann [Berg et al., 1993] und so eine Rest-Adhäsion ermöglichen könnte. Jedoch ist zu beachten, dass in statischen Adhäsionsversuchen wie dem durchgeführten Assay $\alpha_4\beta_7$ dominierend in der Bindung zu sein scheint [Berlin et al., 1993]. Ein adoptiver Transfer von B-Zellen, die mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ vorbehandelt waren, zeigte einen Migrationsphänotyp, der einem Transfer nach *in vitro*-Stimulation mit IFN- α entsprach (siehe 3.3.5). Es konnte so gezeigt werden, dass die alleinige Herunterregulation bzw. Blockade von $\alpha_4\beta_7$ den beobachteten Phänotyp nach poly(I:C)-Behandlung *in vivo* imitiert.

4.1.3.4 Der Einfluss von FTY720 auf die Migration von B-Lymphozyten

Nachdem Vorarbeiten unserer Gruppe gezeigt haben, dass die Atrophie der PP durch die Vorbehandlung mit FTY720 inhibiert werden kann, lag die Erklärung nahe, dass hierdurch ein gesteigerter Ausstrom verhindert wurde. Dieser Mechanismus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass Lymphozyten, die *in vitro* mit IFN- α stimuliert wurden, in FTY720-vorbehandelten Mäusen wieder verstärkt in die PP einwanderten (siehe 3.3.6).

In diesem Zusammenhang wurde vor einiger Zeit festgestellt, dass FTY720 nicht nur den Ausstrom von Lymphozyten aus SLO blockieren kann, sondern auch die Interaktion der Lymphozyten mit dem Endothel bei der Migration in SLO verlängert [O. Pabst et al., 2006]. Die Autoren beschrieben diesen Mechanismus vor allem für β_2 - und β_7 -defiziente Zellen. Lymphozyten mit verminderter Expression von $\alpha_4\beta_7$ würden somit bei der Migration in die PP durch FTY720 unterstützt. In einem ähnlichen Zusammenhang wurde eine gesteigerte Migration in PLN und PP für Lymphozyten CCR7- und CCL19- bzw. CCL21-defizienter Mäuse nach FTY720-Behandlung beobachtet [Henning et al., 2001].

Auch ein Zusammenhang mit der Expression von CD62L wurde in der Vergangenheit beschrieben. So beobachteten Yanagawa et al., dass vor allem CD62L-positive Lymphozyten nach FTY720-Behandlung verstärkt in die PP einwandern [Yanagawa et al., 1998]. Gerade nach IFN- α -Stimulation wurde in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Expression von CD62L beobachtet. FTY720 könnte somit einerseits über eine verlängerte Zell-Endothel-Interaktion der Lymphozyten dem herunterregulierten $\alpha_4\beta_7$ entgegen wirken. Andererseits ist eine gesteigerte Extravasation CD62L-positiver Lymphozyten denkbar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein- und denselben Mechanismus, bei dem sich gewisse Expressionsmuster von *Homing*-Molekülen gegenseitig beeinflussen.

Erwähnenswert ist auch die Beobachtung, dass $S1P_1^{-/-}$ B-Lymphozyten, nicht jedoch $S1P_1^{-/-}$ T-Lymphozyten vermindert in die PP einwandern [Halin et al., 2005]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine verminderte Expression von $S1P_1$ der B-Zellen beobachtet werden. Jedoch beschrieben Halin et al. auch für die PLN eine reduzierte Migration, sodass unklar bleibt, inwiefern dieser Mechanismus beim vorliegenden Phänotyp eine Rolle spielt.

4.2 Integrine als Regulatoren der Architektur lymphatischer Organe

4.2.1 $\alpha_4\beta_7$ ist entscheidend für die Entwicklung und Homöostase der Peyer-Plaques

Es konnte gezeigt werden, dass durch virusassoziierte Immunaktivierung ein Phänotyp hervorgerufen wird, der in der Organ-Morphologie sowie der Lymphozyten-Migrationskapazität dem Phänotyp von $\beta_7^{-/-}$ -Mäusen gleicht [Steeber et al., 1998; Wagner et al., 1996]. In diesen genetisch defizienten Tieren ist die Bildung des GALT stark beeinträchtigt, sodass vor allem Neugeborene anfälliger für parasitäre intestinale Infektionen sind [Mancassola et al., 2004]. Denselben Phänotyp in Anzahl und Zellularität verminderter PP zeigen Mäuse, denen KLF2, der regulierende Transkriptionsfaktor von β_7 , fehlt [Winkelmann et al., 2011]. Ebenfalls ein vermindertes *Homing* in PP und MLN zeigen Lymphozyten, in denen KLF3, der transkriptionelle Repressor von β_7 , überexprimiert wird [Alles et al., 2014]. Hierbei spielt die Bildung des $\alpha_4\beta_7$ Heterodimers die entscheidende Rolle. So führte nicht nur eine Blockade der α_4 -Untereinheit zu einem verminderten *Homing* in die PP [Hamann et al., 1994], sondern auch die Behandlung von Mäusen mit Antikörpern gegen $\alpha_4\beta_7$ zu einer ausgeprägten Atrophie der PP [Heidegger et al., 2013a].

Für Chemokine, die die Migration in SLO vermitteln, wurde eine entsprechende Regulation im Rahmen einer systemischen Immunaktivierung bereits beschrieben [Mueller und Germain, 2009]. So bewirkt eine virale oder bakterielle Infektion die Herunterregulation von CCR7-Liganden, die zu einer veränderten Migration von Lymphozyten in bzw. innerhalb von SLO führt [Mueller et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Regulation auch für Adhäsionsmoleküle gilt. Durch die virusassoziierte Ausschüttung von Typ-I-IFN kommt es zu einer Herunterregulation des Integrins $\alpha_4\beta_7$, wodurch selektiv die Migration in die PP und somit deren Zellularität deutlich reduziert wird.

4.2.2 Überlappende Funktionen der Adhäsionsmoleküle gewährleisten Aufrechterhaltung der Migration in die übrigen sekundären lymphatischen Organe

Je nach Aktivierungsgrad der Lymphozyten können die Funktionen der einzelnen Adhäsionsmoleküle jedoch auch überlappen bzw. sich gegenseitig ersetzen [Bargatze et al., 1995]. So ist CD62L an sich notwendig für die Initiation jedes Extravasationsvorgangs in SLO, vor allem in die PLN. So zeigen CD62L^{-/-}-Mäuse stark verminderte Zellzahlen in den PLN, nicht jedoch in den MLN und PP. Arbonés et al. postulieren, dass letztere durch die Expression von MAdCAM-1 in den HEV $\alpha_4\beta_7$ binden und so die CD62L-Defizienz teilweise kompensieren können [Arbonés et al., 1994]. Im Gegenzug kann das Fehlen von $\alpha_4\beta_7$ auch teilweise durch CD62L ausgeglichen werden, sodass die Migration in die MLN, die ja auch MAdCAM-1 exprimieren, in β_7 -defizienten Tieren aufrecht erhalten wird [Wagner et al., 1998]. In diesem Zusammenhang könnte die leicht verstärkte Expression von CD62L auf B-Lymphozyten induziert durch Typ-I-IFN als Kompensationsmechanismus für die Migration in MLN verstanden werden.

4.3 Die Rolle des Darms im Rahmen systemischer Immunaktivierung

4.3.1 Die verminderte Zellularität der PP als Teil einer Regulation der systemischen Immunantwort

Teil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, inwiefern die verminderte Migration der B-Lymphozyten und somit die Atrophie der PP reversibel ist. So konnte gezeigt werden, dass sich nach ca. 7 Tagen die Expressionslevel von $\alpha_4\beta_7$ normalisiert hatten (siehe 3.4) – passend zu unseren Vorversuchen, die nach zweimaliger poly(I:C)-Injektion eine Normalisierung der Zellularität nach spätestens 20 Tagen zeigten [Heidegger et al., 2013a]. Die vergrößerte Milz und auch die vergrößerten PLN könnten vermuten lassen, dass es sich bei diesem Vorgang um eine Art Rekrutierungsmanöver des Immunsystems handelt, bei dem ein möglichst großer Pool an polyklonalen Lymphozyten der systemischen Zirkulation temporär zur Verfügung gestellt werden soll. Hierdurch könnte eine effizientere Initiierung einer adaptiven Immunantwort ermöglicht bzw. die Immunantwort reguliert werden. Nach der Klärung dieser Infektion fehlt der Stimulus in Form von viralen PAMPs und anschließender Sekretion von Typ-I-IFN, sodass sich die Architektur der lymphatischen Organe allmählich regeneriert. Dieser Mechanismus wurde bereits von Morrison et al. im Rahmen einer bakteriellen Infektion postuliert. Nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* kam es zu einer stark reduzierten Migration von B-Lymphozyten in PLN und PP und stattdessen zu einer verstärkten Migration in die Milz [Morrison et al., 2010]. Auch hierbei handelte es sich um ein transientes Phänomen, sodass sich die Migrationsmuster und somit die lymphatischen Strukturen nach Beseitigung der Infektion normalisierten. Im selben Zusammenhang beschrieben Colombi et al. in einem murinen AIDS-Modell einen ähnlichen Phänotyp mit atrophischen PP, der ebenfalls vor allem durch den Verlust von B-Lymphozyten hervorgerufen wurde [Colombi et al., 1997].

Im Rahmen einer lokalen gastrointestinalen Infektion hingegen beobachtet man eine massive Vergrößerung der PP, hervorgerufen durch enorme B-Zell-Proliferation [Blutt et al., 2002; Lopez-Guerrero et al., 2010]. In diesem Infektionsmodell finden sich in den PP vor allem antigenspezifische B-Lymphozyten, die möglicherweise den Verlust an naiven B-Lymphozyten, der im Rahmen einer systemischen Infektion zu beobachten ist, verschleiern [Heidegger et al., 2013a; Kuklin et al., 2001; Williams et al., 1998]. Neben ursächlicher Proliferation wurde kürzlich auch eine Hypertrophie, resultierend aus vermindertem Ausstrom von Lymphozyten, auch CD69-unabhängig, im Rahmen einer darmspezifischen bakteriellen Infektion beschrieben [Schulz et al., 2014].

4.3.2 Auswirkungen auf die Barrierefunktion und Immunabwehr des Darms

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass sich systemische Virusinfektionen ohne gastrointestinalen Tropismus trotz allem auf den Darm auswirken können. Dies ist bereits für eine Reihe von Viren, auch die nicht typisch darmspezifischen Viren, beschrieben [Openshaw, 2008]. Eine zentrale Rolle spielen hier einerseits Begleiterscheinungen einer systemischen oder typischerweise andernorts lokalisierten Virusinfektion bspw. durch das aviäre Influenzavirus A (H5N1), das ausgeprägte Diarrhoe hervorruft [Tran et al., 2004]. Wie die Lunge konnte auch der Darm als Replikationsort der Viren bestimmt werden, jedoch ohne Nachweis viraler Antigene oder histologischer Veränderungen [Uiprasertkul et al., 2005]. Ein weiterer Pathomechanismus ist der direkte Befall von Lymphozyten bspw. durch das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) [Brenchley et al., 2008]. Des Weiteren kommt es hierbei durch eine Störung der Integrität der intestinalen Mukosa zu vermehrter Transmission von Pathogenen und einer Steigerung der hervorgerufenen Immunaktivierung. So wurden im Rahmen chronischer HIV-Infektionen erhöhte Plasma-LPS-Spiegel als Zeichen einer chronischen gastrointestinalen Barrieredysfunktion gemessen, die sich auch prognostisch ungünstig auswirken kann [Brenchley et al., 2006]. Schließlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein großer Pool an Lymphozyten nicht mehr in die lymphatischen Organe des GIT zirkuliert und somit die mukosale Grundabwehr geschwächt sein könnte. In diesem Zusammenhang beschrieben Williams et al. bereits vor einiger Zeit die Notwendigkeit der Anwesenheit von $\alpha_4\beta_7^+$ B-Lymphozyten im GIT für die Beseitigung einer gastrointestinalen Infektion und die Entstehung lang anhaltender Immunität [Williams et al., 1998].

4.4 Relevanz für moderne therapeutische Regimes

4.4.1 Therapeutische Nutzung von poly(I:C) und IFN- α

IFN- α und poly(I:C) befinden sich in klinischer Anwendung bzw. Testung in verschiedensten Einsatzgebieten. Im Folgenden wird dargestellt, welche möglichen Komplikationen sich daraus durch die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben könnten.

4.4.1.1 *Klinischer Einsatz und mögliche Komplikationen*

Poly(I:C) wird im Rahmen von Impfungen als potentes Adjuvans untersucht, das die Stimulation des Immunsystems verstärkt und somit die Induktion einer effektiven adaptiven Immunantwort bspw. im Rahmen einer Influenza-Impfung fördert [Ichinohe et al., 2005; Perez-Giron et al., 2014].

Großes Interesse besteht an der Verwendung von poly(I:C) im Rahmen antitumoraler Therapien. So wurde für poly(I:C) eine direkte antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen beschrieben [Hirabayashi et al., 1999]. Darüber hinaus kommt es durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Ausschüttung von Typ-I-IFN und inflammatorischen Zytokinen und damit zur Aktivierung verschiedener Immunzellen und Infiltration des Tumorgewebes [Chin et al., 2010]. Diese Effekte lassen poly(I:C) als vielversprechendes Therapeutikum im Rahmen verschiedener antitumoraler Therapieschemata erscheinen [Cheng und Xu, 2011]. So wird es bereits in klinischen Studien auf seine Wirksamkeit überprüft [Ammi et al., 2014] und könnte durch seine gute immunstimulatorische antitumorale Wirkung in Zukunft standardmäßig als Adjuvans eingesetzt werden.

Eine verstärkte Wirksamkeit der poly(I:C)-Therapie bei verschiedenen Tumorentitäten wurde durch eine Vorbehandlung bzw. Kombinationstherapie mit IFN- α erzielt. Hierdurch konnte eine erhöhte Apoptoserate von Tumorzellen bspw. bei einigen Melanomzelllinien [Salaun et al., 2007] sowie in einem Kolonkarzinom-Modell beobachtet werden [Taura et al., 2010].

Typ-I-IFN werden darüber hinaus therapeutisch unterschiedlichst eingesetzt [George et al., 2012]. So wird IFN- α auch bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms, des malignen Melanoms oder verschiedener maligner hämatologischer Erkrankungen eingesetzt [Bracarda et al., 2010]. In der anti-viralen Therapie wird IFN- α standardmäßig aufgrund seiner proapoptotischen und antiproliferativen Wirkung in verschiedenen Schemata der Hepatitis-C-Therapie eingesetzt [Kohli et al., 2014]. Auch für die Therapie einer Hepatitis-B-Erkrankung ist IFN- α im Einsatz [Brunetto und Bonino, 2014].

Bei nahezu allen genannten Einsatzmöglichkeiten handelt es sich um Therapien im Rahmen chronischer Regimes. Gerade hier sollte man aufgrund der kontinuierlichen Applikation von poly(I:C) bzw. IFN- α und der damit verbundenen virusassoziierten Immunaktivierung das mögliche Auftreten einer geschwächten gastrointestinalen Abwehrlage und die eventuell daraus resultierende Anfälligkeit für Infektionen bedenken.

4.4.1.2 IFN- α : Beschränkungen der anti-viralen Potenz

IFN- α als potentes antivirales Zytokin eignet sich jedoch nicht zur Kontrolle aller Virusinfektionen. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die chronisch mit dem *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV) infiziert sind, eine veränderte Architektur lymphatischer Organe aufweisen [Teijaro et al., 2013]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine veränderte Struktur von SLO beobachtet werden. Bei den LCMV-infizierten Tieren konnte eine aufgehobene Milzstruktur und damit verbundene negative immunregulatorische Mechanismen beobachtet werden, sodass eine Bekämpfung der Infektion erschwert war. Durch eine Blockade der IFN- α -Signalkaskade erholten sich die lymphatischen Strukturen und eine Beseitigung der Infektion war möglich [Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013]. Zudem muss bedacht werden, dass Viren, die sehr mutationsfähig sind, *Exit*-Strategien entwickeln, um der IFN-Kontrolle zu entkommen [Devasthanam, 2014]. So wurde für Influenza-Viren beschrieben, dass diese die Wirkung von IFN- α erfolgreich blockieren und so ihre pathogene Wirkung entfalten können [Molledo et al., 2009]. Auch für das *Respiratory Syncytial virus* (RSV) und das Masernvirus konnte eine Hemmung der IFN- α -Produktion nachgewiesen werden [Schlender et al., 2005].

4.4.2 $\alpha_4\beta_7$ als therapeutische Zielstruktur

Aus der beobachteten Wirkung der modulierten Expression von $\alpha_4\beta_7$ auf die Zellularität der PP bzw. aus dem daraus resultierenden *Rerouting* der Lymphozyten ergeben sich Überlegungen, die $\alpha_4\beta_7$ als interessante therapeutische Zielstruktur erscheinen lassen.

4.4.2.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Als äußerst attraktive Zielstruktur erscheint $\alpha_4\beta_7$, welches im Rahmen systemischer virusassoziierter Immunaktivierung vermindert exprimiert wird und somit zu reduzierter Migration von Lymphozyten in die PP führt (siehe 3.3), im Rahmen der Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Bei der multifaktoriellen Pathogenese dieser Erkrankungen spielen genetische Faktoren, die kommensale intestinale Flora und eine unangemessene angeborene und adaptive Immunantwort eine Rolle [Engel und Neurath, 2010]. Die traditionelle Therapie der CED umfasst unspezifische Immunsuppressiva wie Kortikosteroide, 5-Aminosalicylsäure, Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Methotrexat, die jedoch häufig

nicht zur Remission führen [Peyrin-Biroulet und Lemann, 2011]. Doch auch unter Patienten, die mit neueren sogenannten *Biologicals* in Form von monoklonalen anti-TNF- α Antikörpern therapiert werden, gibt es nach wie vor eine Reihe an Non-Respondern [Ben-Horin et al., 2014]. Die zugrunde liegende Migration und dysfunktionale Rekrutierung der Leukozyten in den GIT zu hemmen und so die florierende Entzündung zu mildern, erscheint daher bereits seit einigen Jahren als attraktiver Ansatz alternativer Therapien. Insbesondere die Blockade von beteiligten Strukturen der Adhäsionskaskade wie Integrine und deren Liganden, Chemokine und Chemokinrezeptoren werden intensiv untersucht [Bamias et al., 2013; Thomas und Baumgart, 2012]. So zeigte der monoklonale anti- α_4 Antikörper Natalizumab, der bereits für die Therapie der Multiplen Sklerose zugelassen ist, erhöhte Remissionsraten und verbesserte Lebensqualität bei Patienten mit Morbus Crohn [Ghosh et al., 2003], ist dafür jedoch nur in den USA zugelassen. Die aussichtsreichere Zielstruktur scheint das Integrin $\alpha_4\beta_7$ zu sein, sodass seit Mai 2014 der dort angreifende monoklonale Antikörper Vedolizumab auch in Europa zugelassen ist [Raine, 2014]. Hier konnte eine erhöhte Remissionswahrscheinlichkeit sowohl für die Colitis ulcerosa [Feagan et al., 2013], als auch für Morbus Crohn [Sandborn et al., 2013] gezeigt werden, wenn auch nicht uneingeschränkt. Erwähnenswert sind sicherlich die beobachteten geringeren Nebenwirkungen dieses Antikörpers im Vergleich mit Natalizumab, da die Migrationshemmung der Leukozyten selektiv den GIT betrifft. Vor diesem Hintergrund befinden sich derzeit eine Reihe anderer Substanzen, die spezifisch Zell-Endothelzell-Interaktionen im GIT hemmen, in der Studienphase [Danese und Panes, 2014]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein hemmender Effekt des blockierenden Antikörpers gegen $\alpha_4\beta_7$ auf die Migration von Lymphozyten in die PP gezeigt werden (siehe 3.3.5). Grundsätzlich erscheinen neben $\alpha_4\beta_7$ eine Reihe anderer Adhäsionsmoleküle, die eine gewebespezifische Migration bedingen, als interessante Angriffspunkte bei der Therapie verschiedenster akuter oder chronischer Erkrankungen.

4.4.2.2 Graft-versus-Host-Disease

Eine schwere und ernstzunehmende Komplikation im Rahmen einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) ist die *Graft-versus-Host-Erkrankung* (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD), die unterschiedliche Organe wie Haut, Leber und GIT betreffen kann [Ferrara und Deeg, 1991]. Im Rahmen dieser multifaktoriell bedingten Reaktion greifen zytotoxische T-Lymphozyten des Spenders und andere Effektorzellen das als fremd erkannte Gewebe des Empfängers an [Welniak et al., 2007]. Im Mausmodell wurden die PP als entscheidender Induktionsort dieser aktivierten T-Lymphozyten beschrieben, da PP-defiziente Mäuse keine intestinale GvHD

entwickelten. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass eine Blockade von MAdCAM-1 Mäuse vor der Entwicklung einer intestinalen GvHD schützt [Murai et al., 2003]. Im selben Kontext wurde beschrieben, dass die Expression des *Homing*-Moleküls $\alpha_4\beta_7$ das Auftreten und die Schwere der murinen intestinalen GvHD wesentlich mitbestimmt [Petrovic et al., 2004] und dass Empfängerermäuse nach HSCT von β_7 -defizienten T-Zellen deutlich weniger anfällig für die intestinale GvHD sind als Kontrolltiere [Waldman et al., 2006]. Schließlich konnte vor Kurzem im Rahmen humaner intestinaler GvHD zum Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome ein erhöhter Anteil an $\alpha_4\beta_7$ exprimierenden CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten nachgewiesen werden [Chen et al., 2013]. In Zusammenschau mit der beobachteten verminderten Migration in die PP nach Herunterregulation von $\alpha_4\beta_7$ (siehe 3.3) lassen diese Ergebnisse $\alpha_4\beta_7$ als möglichen diagnostischen und prognostischen Marker und als attraktiven therapeutischen Angriffspunkt im Rahmen intestinaler GvHD erscheinen.

4.4.2.3 HIV

Charakteristisch für HIV-Infektionen des Menschen bzw. die Infektion von Primaten mit dem *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) ist unabhängig vom Infektionsweg der bevorzugte Befall des GIT. Hier wird vor allem eine Reduktion der zahlreich vorhandenen CCR5⁺CD4⁺ T-Lymphozyten beobachtet, möglicherweise durch direkte Infektion [Brenchley et al., 2004; Veazey et al., 1998]. Dieses Befallsmuster führt zum charakteristischen Verlust der CD4⁺ T-Zellen mit konsekutiv resultierender Immundefizienz. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha_4\beta_7$ als Rezeptor für ein Hüllprotein des HIV bzw. SIV dienen und so die Replikation und Streuung des Virus ermöglichen könnte [Arthos et al., 2008]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine kürzlich durchgeführte Studie an DCs und CD4⁺ T-Lymphozyten der zervikalen Schleimhaut, die durch Blockade der Integrine α_4 , β_7 und β_1 eine deutlich reduzierte Infektion mit HIV-1 aufwiesen [Tjomsland et al., 2013]. Das Integrin $\alpha_4\beta_7$ als therapeutischen Angriffspunkt näher zu untersuchen, scheint daher naheliegend. Vor diesem Hintergrund wurden vor einiger Zeit Studien an mit SIV infizierten Rhesusaffen durchgeführt, die vor und während der Infektion mit einem blockierenden, nicht-depletierenden monoklonalen Antikörper gegen $\alpha_4\beta_7$ behandelt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Applikation des Antikörpers zu einer verzögert auftretenden und verminderten Viruslast sowohl im Plasma als auch im GIT führt [Ansari et al., 2011]. Ob dieser Effekt durch die Blockade von $\alpha_4\beta_7$ der Bindungshemmung des SIV-Hüllproteins oder einer verminderten Migration der sonst dort befallenen T-Lymphozyten in den GIT geschuldet ist, wie sie auch in der

vorliegenden Arbeit bei B-Lymphozyten beobachtet werden konnte (siehe 3.3.5), bleibt noch unklar. Er unterstreicht jedoch die vielfältigen Funktionen von $\alpha_4\beta_7$ und die daraus resultierende therapeutische Relevanz der Untersuchungen dieses Integrins.

5 Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt bildet die größte Grenzfläche des menschlichen Körpers zur Umwelt und befindet sich in stetem Kontakt mit möglichen pathogenen Erregern. Für eine effiziente Immunabwehr ist die adäquate Positionierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in den verschiedenen Immunkompartimenten und Geweben von entscheidender Bedeutung.

Über den Einfluss virusassoziierter Immunaktivierung auf die Verteilung von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen des Gastrointestinaltrakts ist wenig bekannt. In diesem Zusammenhang zeigten Vorarbeiten unserer Gruppe, dass eine virusassoziierte Ausschüttung von Typ-I-Interferonen zu einer reversiblen Atrophie der Peyer-Plaques, nicht jedoch der peripheren Lymphknoten führt. Ziel der vorliegenden Arbeit war nun die Untersuchung zugrunde liegender zellulärer und molekularer Mechanismen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass weder gesteigerte Apoptose, noch verminderte Proliferation von Zellen der Peyer-Plaques den beobachteten Phänotyp hervorrufen. Außerdem konnte ein verstärkter Ausstrom von Lymphozyten als zugrundeliegender Mechanismus der beobachteten Atrophie ausgeschlossen werden. Bezüglich der gewebespezifischen Migration von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe zeigte sich, dass eine virusassoziierte Immunaktivierung eine Herunterregulation des lymphozytären Integrins $\alpha_4\beta_7$ bewirkt. Dadurch kommt es zu einem verminderten Einstrom von Lymphozyten in die Peyer-Plaques, nicht jedoch in die peripheren Lymphknoten.

Wir konnten somit zeigen, dass im Rahmen systemischer virusassoziierter Immunaktivierung eine Regulation von Integrinen stattfindet, welche die Zellularität und Architektur verschiedener sekundärer lymphatischer Organe unterschiedlich beeinflussen kann. Diese lymphozytäre Umverteilung könnte den Kontakt zu spezifischen Antigenen erleichtern. Jedoch ist eine damit verbundene Schwächung der gastrointestinalen Abwehr denkbar, auch bei chronischen Therapieregimes mit Immunstimulanzien wie Interferon- α . Gleichzeitig erscheinen Integrine als attraktive therapeutische Zielstrukturen bei Erkrankungen mit charakteristischem gastrointestinalen Befall, die durch eine fehlerhafte lymphozytäre Rezirkulation begünstigt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCL	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CPD670	<i>Cellproliferation dye eFluor 670</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Oligonukleotid
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)

GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GvHD	<i>Graft-versus-host-disease</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	<i>Hours</i> (Stunden)
HCl	Hydrochlorid
HEV	<i>High endothelial venules</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IEC	<i>Intestinal epithelial cells</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α -Rezeptor
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
KLF	Krüppel- <i>like</i> -Faktor
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPAM-1	<i>Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MLN	<i>Mesenteric lymph nodes</i> (mesenteriale Lymphknoten)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pDCs	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
PE	R-Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PLN	<i>Peripheral lymph nodes</i> (periphere Lymphknoten)
PNAd	<i>Peripheral node addressin</i>
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PP	Peyer-Plaques
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLR	RIG-I-like-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P ₁	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
ssRNA	<i>Single stranded RNA</i>
SSC	<i>Side scatter</i> (Seitwärts-Streuung)

TEMED	Tetramethylethylenediamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLE	<i>Very low endotoxin</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Bedeutende Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Liganden für die vorliegende Arbeit	4
Abbildung 1.2: Schematischer Ablauf der Migration in SLO.....	6
Abbildung 1.3: Der Zyklus der S1P ₁ -Expression und die S1P-vermittelte Rezirkulation der Lymphozyten	7
Abbildung 1.4: Mögliche Mechanismen der Atrophie lymphatischen Gewebes	14
Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des adoptiven B-Zell-Transfers nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	25
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des <i>in-vitro</i> Chemotaxis-Assays am Beispiel von unstimulierten Splenozyten	28
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise des <i>in vitro</i> MAdCAM-1-Adhäsions-Assays am Beispiel von unstimulierten B-Lymphozyten.....	29
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers	30
Abbildung 3.1: Absolute Zellzahl (B-Lymphozyten) in Milz, PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	37
Abbildung 3.2: Proliferation in Milz, PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	38
Abbildung 3.3: Apoptose-Raten in PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	40
Abbildung 3.4: Relative S1P ₁ -mRNA-Level von B-Lymphozyten aus PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	42
Abbildung 3.5: S1P ₁ -Expression auf B-Lymphozyten aus PLN und PP nach poly(I:C)-Behandlung <i>in vivo</i>	43
Abbildung 3.6: Chemotaxis von B-Lymphozyten der Milz in Richtung S1P	44
Abbildung 3.7: Chemotaxis von Gesamtzellen aus PLN und PP in Richtung S1P	46
Abbildung 3.8: Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Stimulation mit Typ-I-IFN und Kultur-Überständen poly(I:C)-stimulierter Splenozyten	47

Abbildung 3.9: Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CD62L auf B-Lymphozyten nach Kultivierung in der Gegenwart von EMCV und VSV	48
Abbildung 3.10: Adhäsion IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten an MAdCAM-1 <i>in vitro</i>	49
Abbildung 3.11: <i>Homing</i> IFN- α -stimulierter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter Mäuse	52
Abbildung 3.12: <i>Homing</i> Antikörper-behandelter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter Mäuse	53
Abbildung 3.13: Homing IFN- α -behandelter B-Lymphozyten in Milz, PLN und PP unbehandelter und FTY720-behandelter Mäuse	54
Abbildung 3.14: $\alpha_4\beta_7$ -Expression auf B-Lymphozyten aus PP poly(I:C)-behandelter Mäuse nach 1 und 7 Tagen	55

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toll-like-Rezeptoren und ihre spezifischen Liganden	9
Tabelle 2: Detektierbare Fluorochrome mit Exzitations- und Emissions-Maxima	31

8 Literaturverzeichnis

- Ahlawat, S., De Jesus, M., Khare, K., Cole, R. A. and Mantis, N. J. (2014). Three-dimensional reconstruction of murine Peyer's patches from immunostained cryosections. *Microsc Microanal* 20(1): 198-205.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-738.
- Allende, M. L., Dreier, J. L., Mandala, S. and Proia, R. L. (2004). Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279(15): 15396-15401.
- Allende, M. L., Tuymetova, G., Lee, B. G., Bonifacino, E., Wu, Y.-P. and Proia, R. L. (2010). S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med* 207(5): 1113-1124.
- Alles, M., Turchinovich, G., Zhang, P., Schuh, W., Agenès, F. and Kirberg, J. (2014). Leukocyte β 7 integrin targeted by Krüppel-like factors. *J Immunol* 193(4): 1737-1746.
- Alsharifi, M., Lobigs, M., Regner, M., Lee, E., Koskinen, A. and Müllbacher, A. (2005). Type I interferons trigger systemic, partial lymphocyte activation in response to viral infection. *J Immunol* 175(7): 4635-4640.
- Ammi, R., De Waele, J., Willemen, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D. M., Lion, E. and Smits, E. L. (2014). Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther*.
- Andrew, D. P., Spellberg, J. P., Takimoto, H., Schmits, R., Mak, T. W. and Zukowski, M. (1998). Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice. *Eur J Immunol* 28(6): 1959-1969.
- Ansari, A. A., Reimann, K. A., Mayne, A. E., Takahashi, Y., Stephenson, S. T., Wang, R., Wang, X., Li, J., Price, A. A. and Little, D. M. (2011). Blocking of α 4 β 7 gut-homing integrin during acute infection leads to decreased plasma and gastrointestinal tissue viral loads in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 186(2): 1044-1059.
- Anz, D., Thaler, R., Stephan, N., Waibler, Z., Trauscheid, M. J., Scholz, C., Kalinke, U., Barchet, W., Endres, S. and Bourquin, C. (2009). Activation of melanoma differentiation-associated gene 5 causes rapid involution of the thymus. *J Immunol* 182(10): 6044-6050.
- Arbonés, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J. and Teddert, T. F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1(4): 247-260.
- Arpaia, N. and Barton, G. M. (2011). Toll-like receptors: key players in antiviral immunity. *Curr Opin Virol* 1(6): 447-454.

- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T. D., Conrad, T. P., Lempicki, R. A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C. C., Censoplano, N., Chung, E., Reitano, K. N., Kottlil, S., Goode, D. J. and Fauci, A. S. (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9(3): 301-309.
- Bamias, G., Clark, D. J. and Rivera-Nieves, J. (2013). Leukocyte traffic blockade in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets* 14(12): 1490.
- Bargatze, R. F., Jutila, M. A. and Butcher, E. C. (1995). Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha 4 \beta 7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3(1): 99-108.
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussallant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M. and Hugot, J. P. (2007). CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One* 2(6): e523.
- Barton, G. M. (2007). Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 19(1): 33-40.
- Ben-Horin, S., Kopylov, U. and Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 13(1): 24-30.
- Berg, E., McEvoy, L., Berlin, C., Bargatze, R. and Butcher, E. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366(6456): 695-698.
- Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A. and Butcher, E. C. (1993). $\alpha 4 \beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74(1): 185-195.
- Blutt, S. E., Warfield, K. L., Lewis, D. E. and Conner, M. E. (2002). Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J Immunol* 168(11): 5716-5721.
- Bracarda, S., Eggermont, A. M. and Samuelsson, J. (2010). Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases. *Eur J Cancer* 46(2): 284-297.
- Brandtzaeg, P., Baekkevold, E., Farstad, I., Jahnsen, F., Johansen, F., Nilsen, E. and Yamanaka, T. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 20(3): 141-151.
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R. and Russell, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 1(1): 31-37.
- Braun, D., Caramalho, I. and Demengeot, J. (2002). IFN- α/β enhances BCR-dependent B cell responses. *Int Immunol* 14(4): 411-419.
- Brenchley, J. M., Paiardini, M., Knox, K. S., Asher, A. I., Cervasi, B., Asher, T. E., Scheinberg, P., Price, D. A., Hage, C. A. and Kholi, L. M. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112(7): 2826-2835.

- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O. and Altmann, D. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12(12): 1365-1371.
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T. and Douek, D. C. (2004). CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200(6): 749-759.
- Browne, E. P. (2012). Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 136(4): 370-379.
- Brunetto, M. R. and Bonino, F. (2014). Interferon therapy of chronic hepatitis B. *Intervirology* 57(3-4): 163-170.
- Carlson, C. M., Endrizzi, B. T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E. R., Wani, M. A., Lingrel, J. B., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442(7100): 299-302.
- Chen, Y. B., McDonough, S., Chen, H., Kennedy, J., Illiano, C., Attar, E. C., Ballen, K. K., Dey, B. R., McAfee, S. L., Jagasia, M., Soiffer, R., Spitzer, T. R. and Ritz, J. (2013). Expression of $\alpha 4\beta 7$ integrin on memory CD8(+) T cells at the presentation of acute intestinal GVHD. *Bone Marrow Transplant* 48(4): 598-603.
- Cheng, Y.-s. and Xu, F. (2011). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biol Ther* 10(12): 1219-1223.
- Chin, A. I., Miyahira, A. K., Covarrubias, A., Teague, J., Guo, B., Dempsey, P. W. and Cheng, G. (2010). Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res* 70(7): 2595-2603.
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5(7): 713-720.
- Clemens, M. J. (2003). Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 23(6): 277-292.
- Colombi, S., Moutschen, M., de Leval, L., Demoitié, M. A., Trebak, M., Martin, M. T. and Boniver, J. (1997). Peyer's patches in murine AIDS: dissociation between lymphoproliferation and anergy. *Scand J Immunol* 45(2): 175-181.
- Cornes, J. (1965). Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut* 6(3): 225.
- Cyster, J. G. and Schwab, S. R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 30: 69-94.
- Danese, S. and Panes, J. (2014). Development of drugs to target interactions between leukocytes and endothelial cells and treatment algorithms for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 147(5): 981-989.

- DeNucci, C. C., Pagán, A. J., Mitchell, J. S. and Shimizu, Y. (2010). Control of $\alpha 4\beta 7$ integrin expression and CD4 T cell homing by the $\beta 1$ integrin subunit. *J Immunol* 184(5): 2458-2467.
- Devasthanam, A. S. (2014). Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence* 5(2): 270-277.
- Dinarello, C. A. (1999). Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 179(Supplement 2): S294-S304.
- Engel, M. A. and Neurath, M. F. (2010). New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 45(6): 571-583.
- Essers, M. A., Offner, S., Blanco-Bose, W. E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M. A. and Trumpp, A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458(7240): 904-908.
- Feagan, B. G., Rutgeerts, P., Sands, B. E., Hanauer, S., Colombel, J. F., Sandborn, W. J., Van Assche, G., Axler, J., Kim, H. J., Danese, S., Fox, I., Milch, C., Sankoh, S., Wyant, T., Xu, J. and Parikh, A. (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 369(8): 699-710.
- Ferrara, J. L. and Deeg, H. J. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324(10): 667-674.
- George, P. M., Badiger, R., Alazawi, W., Foster, G. R. and Mitchell, J. A. (2012). Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther* 135(1): 44-53.
- Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F. H., Malchow, H. A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnaelek, P., Zadorova, Z., Palmer, T. and Donoghue, S. (2003). Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 348(1): 24-32.
- Gilliet, M., Cao, W. and Liu, Y. J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8(8): 594-606.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22): 8459-8464.
- Goodman-Snitkoff, G. W. and McSharry, J. J. (1980). Activation of mouse lymphocytes by vesicular stomatitis virus. *J Virol* 35(3): 757-765.
- Graler, M. H. and Goetzl, E. J. (2004). The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *Faseb j* 18(3): 551-553.
- Halin, C., Scimone, M. L., Bonasio, R., Gauguier, J.-M., Mempel, T. R., Quackenbush, E., Proia, R. L., Mandal, S. and von Andrian, U. H. (2005). The S1P-analog FTY720 differentially modulates T-cell homing via HEV: T-cell-expressed S1P1 amplifies integrin activation in peripheral lymph nodes but not in Peyer patches. *Blood* 106(4): 1314-1322.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B. and Butcher, E. C. (1994). Role of $\alpha 4$ -integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 152(7): 3282-3293.

- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832): 1099-1103.
- Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol* 14(10): 978-985.
- Heidegger, S., Anz, D., Stephan, N., Bohn, B., Herbst, T., Fendler, W. P., Suhartha, N., Sandholzer, N., Kobold, S., Hotz, C., Eisenacher, K., Radtke-Schuller, S., Endres, S. and Bourquin, C. (2013a). Virus-associated activation of innate immunity induces rapid disruption of Peyer's patches in mice. *Blood* 122(15): 2591-2599.
- Heidegger, S., Kirchner, S. K., Stephan, N., Bohn, B., Suhartha, N., Hotz, C., Anz, D., Sandholzer, N., Stecher, B., Russmann, H., Endres, S. and Bourquin, C. (2013b). TLR activation excludes circulating naive CD8⁺ T cells from gut-associated lymphoid organs in mice. *J Immunol* 190(10): 5313-5320.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663): 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3(2): 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H. and Takeda, K. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-745.
- Henning, G., Ohl, L., Junt, T., Reiterer, P., Brinkmann, V., Nakano, H., Hohenberger, W., Lipp, M. and Förster, R. (2001). CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing modulation by FTY720. *J Exp Med* 194(12): 1875-1881.
- Hermesh, T., Molledo, B., Moran, T. M. and López, C. B. (2010). Antiviral instruction of bone marrow leukocytes during respiratory viral infections. *Cell Host Microbe* 7(5): 343-353.
- Hirabayashi, K., Yano, J., Inoue, T., Yamaguchi, T., Tanigawara, K., Smyth, G. E., Ishiyama, K., Ohgi, T., Kimura, K. and Irimura, T. (1999). Inhibition of cancer cell growth by polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome complex: a new biological activity. *Cancer Res* 59(17): 4325-4333.
- Holzmann, B., McIntyre, B. W. and Weissman, I. L. (1989). Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4 α . *Cell* 56(1): 37-46.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162(7): 3749-3752.

- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1): 11-25.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6): 673-687.
- Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T. and Hasegawa, H. (2005). Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79(5): 2910-2919.
- Igyarto, B. Z. and Kaplan, D. H. (2013). Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol* 25(1): 115-119.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 258-267.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963): 291-295.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20(1): 197-216.
- Jung, C., Hugot, J.-P. and Barreau, F. (2010). Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int J Inflam* 2010.
- Kaplan, D. H. (2010). In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends Immunol* 31(12): 446-451.
- Kato, H., Takahasi, K. and Fujita, T. (2011). RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev* 243(1): 91-98.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205(7): 1601-1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T. and Ishii, K. J. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441(7089): 101-105.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
- Kelsall, B. L. and Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183(1): 237-247.
- Koblansky, A. A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M. S., Akira, S., Sher, A. and Ghosh, S. (2013). Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38(1): 119-130.
- Kohli, A., Shaffer, A., Sherman, A. and Kottlilil, S. (2014). Treatment of hepatitis C: a systematic review. *Jama* 312(6): 631-640.

- Kuklin, N. A., Rott, L., Feng, N., Conner, M. E., Wagner, N., Müller, W. and Greenberg, H. B. (2001). Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on $\alpha 4\beta 7$ integrin expression but does not require IgA antibody production. *J Immunol* 166(3): 1894-1902.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420: 1-16.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1): 16-34.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T. and Anderson, L. J. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1(5): 398-401.
- Lo, C. G., Xu, Y., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2005). Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* 201(2): 291-301.
- López, C. B. and Hermesh, T. (2011). Systemic responses during local viral infections: type I IFNs sound the alarm. *Curr Opin Immunol* 23(4): 495-499.
- Lopez-Guerrero, D. V., Meza-Perez, S., Ramirez-Pliego, O., Santana-Calderon, M. A., Espino-Solis, P., Gutierrez-Xicotencatl, L., Flores-Romo, L. and Esquivel-Guadarrama, F. R. (2010). Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice. *J Virol* 84(4): 1856-1866.
- Lund, J., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. and Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5598-5603.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198(3): 513-520.
- Mancassola, R., Lacroix-Lamandé, S., Barrier, M., Naciri, M., Salmon, H. and Laurent, F. (2004). Increased susceptibility of $\beta 7$ -integrin-deficient neonatal mice in the early stage of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 72(6): 3634-3637.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W. and Rosen, H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296(5566): 346-349.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427(6972): 355-360.
- McAllister, C. S., Lakhdari, O., de Chambrun, G. P., Gareau, M. G., Broquet, A., Lee, G. H., Shenouda, S., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F. (2013). TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo. *J Immunol* 190(1): 418-427.

- Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3): 295-298.
- Miyakawa, M. (1959). The lymphatic system of germfree guinea pigs. *Ann N Y Acad Sci* 78: 221-236.
- Molledo, B., Lopez, C. B., Pazos, M., Becker, M. I., Hermesh, T. and Moran, T. M. (2009). Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity. *J Immunol* 183(6): 3569-3573.
- Morrison, V. L., Barr, T. A., Brown, S. and Gray, D. (2010). TLR-mediated loss of CD62L focuses B cell traffic to the spleen during *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 185(5): 2737-2746.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3(4): 331-341.
- Mueller, S. N. and Germain, R. N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(9): 618-629.
- Mueller, S. N., Hosiawa-Meagher, K. A., Konieczny, B. T., Sullivan, B. M., Bachmann, M. F., Locksley, R. M., Ahmed, R. and Matloubian, M. (2007). Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science* 317(5838): 670-674.
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264(5167): 1918-1921.
- Muller, W. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol* 50(1): 7-22.
- Murai, M., Yoneyama, H., Ezaki, T., Suematsu, M., Terashima, Y., Harada, A., Hamada, H., Asakura, H., Ishikawa, H. and Matsushima, K. (2003). Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 4(2): 154-160.
- Neutra, M. R., Frey, A. and Kraehenbuhl, J.-P. (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86(3): 345-348.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J. and Kraehenbuhl, J.-P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2(11): 1004-1009.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164(2): 558-561.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M. and Dreher, S. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337(6098): 1111-1115.
- Openshaw, P. (2008). Crossing barriers: infections of the lung and the gut. *Mucosal Immunol* 2(2): 100-102.

- Pabst, O., Herbrand, H., Willenzon, S., Worbs, T., Schippers, A., Müller, W., Bernhardt, G. and Förster, R. (2006). Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires Gai signaling and depends on $\beta 2$ and $\beta 7$ integrin. *J Immunol* 176(3): 1474-1480.
- Pabst, R., Russell, M. W. and Brandtzaeg, P. (2008). Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. *Trends Immunol* 29(5): 206-208; author reply 209-210.
- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y. and Cyster, J. G. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316(5822): 295-298.
- Perez-Giron, J. V., Belicha-Villanueva, A., Hassan, E., Gomez-Medina, S., Cruz, J. L., Ludtke, A., Ruibal, P., Albrecht, R. A., Garcia-Sastre, A. and Munoz-Fontela, C. (2014). Mucosal polyinosinic-polycytidylic acid improves protection elicited by replicating influenza vaccines via enhanced dendritic cell function and T cell immunity. *J Immunol* 193(3): 1324-1332.
- Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. and Samuel, C. E. (1987). Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777.
- Petrovic, A., Alpdogan, O., Willis, L. M., Eng, J. M., Greenberg, A. S., Kappel, B. J., Liu, C., Murphy, G. J., Heller, G. and van den Brink, M. R. (2004). LPAM ($\alpha 4\beta 7$ integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 103(4): 1542-1547.
- Peyrin-Biroulet, L. and Lemann, M. (2011). Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 33(8): 870-879.
- Pham, T. H., Baluk, P., Xu, Y., Grigorova, I., Bankovich, A. J., Pappu, R., Coughlin, S. R., McDonald, D. M., Schwab, S. R. and Cyster, J. G. (2010). Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* 207(1): 17-27.
- Pham, T. H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G. and Cyster, J. G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by Gai-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28(1): 122-133.
- Phipps-Yonas, H., Seto, J., Sealfon, S. C., Moran, T. M. and Fernandez-Sesma, A. (2008). Interferon- β pretreatment of conventional and plasmacytoid human dendritic cells enhances their activation by influenza virus. *PLoS Pathog* 4(10): e1000193.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M. and Galanos, C. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396): 2085-2088.
- Postigo, A. A., Sanchez-Mateos, P., Lazarovits, A., Sanchez-Madrid, F. and De Landazuri, M. (1993). $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. Expression and function of $\alpha 4$ integrins on human B lymphocytes. *J Immunol* 151(5): 2471-2483.
- Raine, T. (2014). Vedolizumab for inflammatory bowel disease: Changing the game, or more of the same? *United European Gastroenterol J* 2(5): 333-344.

- Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., MacSharry, J. and Brint, E. (2013). Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 191(12): 6084-6092.
- Rumbo, M., Anderle, P., Didierlaurent, A., Sierro, F., Debard, N., Sirard, J. C., Finke, D. and Kraehenbuhl, J. P. (2004). How the gut links innate and adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1029: 16-21.
- Salaun, B., Lebecque, S., Matikainen, S., Rimoldi, D. and Romero, P. (2007). Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4565-4574.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14(4): 778-809.
- Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Rutgeerts, P., Hanauer, S., Colombel, J. F., Sands, B. E., Lukas, M., Fedorak, R. N., Lee, S., Bressler, B., Fox, I., Rosario, M., Sankoh, S., Xu, J., Stephens, K., Milch, C. and Parikh, A. (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 369(8): 711-721.
- Sangfelt, O. and Strander, H. (2001). Apoptosis and cell growth inhibition as antitumor effector functions of interferons. *Med Oncol* 18(1): 3-14.
- Schlender, J., Hornung, V., Finke, S., Gunthner-Biller, M., Marozin, S., Brzozka, K., Moghim, S., Endres, S., Hartmann, G. and Conzelmann, K. K. (2005). Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* 79(9): 5507-5515.
- Schulz, O., Ugur, M., Friedrichsen, M., Radulovic, K., Niess, J. H., Jalkanen, S., Krueger, A. and Pabst, O. (2014). Hypertrophy of infected Peyer's patches arises from global, interferon-receptor, and CD69-independent shutdown of lymphocyte egress. *Mucosal Immunol* 7(4): 892-904.
- Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J. G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309(5741): 1735-1739.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274(25): 17406-17409.
- Shimaoka, M. and Springer, T. A. (2003). Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* 2(9): 703-716.
- Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G. and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440(7083): 540-544.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284(5421): 1835-1837.
- Singer, B. A. (2013). Fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 13(6): 589-602.

- Steeber, D. A., Tang, M. L., Zhang, X.-Q., Müller, W., Wagner, N. and Tedder, T. F. (1998). Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and $\beta 7$ integrin. *J Immunol* 161(12): 6638-6647.
- Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E. and von Andrian, U. H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* 191(1): 61-76.
- Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F. and Butcher, E. C. (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331(6151): 41-46.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y. and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8⁺ T cell accrual. *Immunity* 33(6): 955-966.
- Takada, Y., Ye, X. and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8(5): 215.
- Takeda, K. and Akira, S. (2007). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol Chapter 14*: Unit 14.12.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13(7): 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169(1): 10-14.
- Taura, M., Fukuda, R., Suico, M. A., Eguma, A., Koga, T., Shuto, T., Sato, T., Morino-Koga, S. and Kai, H. (2010). TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci* 101(7): 1610-1617.
- Teijaro, J. R., Ng, C., Lee, A. M., Sullivan, B. M., Sheehan, K. C., Welch, M., Schreiber, R. D., de la Torre, J. C. and Oldstone, M. B. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340(6129): 207-211.
- Thomas, S. and Baumgart, D. C. (2012). Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 20(1): 1-18.
- Thompson, A. J. and Locarnini, S. A. (2007). Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol* 85(6): 435-445.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. and Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3(6): 920-940.
- Tjomsland, V., Ellegard, R., Kjolhede, P., Wodlin, N. B., Hinkula, J., Lifson, J. D. and Larsson, M. (2013). Blocking of integrins inhibits HIV-1 infection of human cervical mucosa immune cells with free and complement-opsonized virions. *Eur J Immunol* 43(9): 2361-2372.

- Tran, T. H., Nguyen, T. L., Nguyen, T. D., Luong, T. S., Pham, P. M., Nguyen v, V., Pham, T. S., Vo, C. D., Le, T. Q., Ngo, T. T., Dao, B. K., Le, P. P., Nguyen, T. T., Hoang, T. L., Cao, V. T., Le, T. G., Nguyen, D. T., Le, H. N., Nguyen, K. T., Le, H. S., Le, V. T., Christiane, D., Tran, T. T., Menno de, J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P. and Farrar, J. (2004). Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 350(12): 1179-1188.
- Uiprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Srisook, K., Peiris, M., Nicholls, J. M., Chokephaibulkit, K., Vanprapar, N. and Auewarakul, P. (2005). Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 11(7): 1036-1041.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401(6755): 811-815.
- Van Kruiningen, H. J., West, A. B., Freda, B. J. and Holmes, K. A. (2002). Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflamm Bowel Dis* 8(3): 180-185.
- Veazey, R. S., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., Shvetz, D. E., Pauley, D. R., Knight, H. L., Rosenzweig, M., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C. and Lackner, A. A. (1998). Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280(5362): 427-431.
- von Andrian, U. H. and Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration—two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343(14): 1020-1034.
- von Andrian, U. H. and Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3(11): 867-878.
- Wagner, N., Löhler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K. and Muller, W. (1996). Critical role for $\beta 7$ integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382(6589): 366-370.
- Wagner, N., Löhler, J., Tedder, T. F., Rajewsky, K., Müller, W. and Steeber, D. A. (1998). L-selectin and $\beta 7$ integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. *Eur J Immunol* 28(11): 3832-3839.
- Waldman, E., Lu, S. X., Hubbard, V. M., Kochman, A. A., Eng, J. M., Terwey, T. H., Muriglan, S. J., Kim, T. D., Heller, G., Murphy, G. F., Liu, C., Alpdogan, O. and van den Brink, M. R. (2006). Absence of $\beta 7$ integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 107(4): 1703-1711.
- Warnock, R. A., Askari, S., Butcher, E. C. and von Andrian, U. H. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187(2): 205-216.
- Warnock, R. A., Campbell, J. J., Dorf, M. E., Matsuzawa, A., McEvoy, L. M. and Butcher, E. C. (2000). The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 191(1): 77-88.
- Welniak, L. A., Blazar, B. R. and Murphy, W. J. (2007). Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25: 139-170.
- Welsch, U. (2006). *Sobotta Lehrbuch Histologie*: Elsevier, Urban&FischerVerlag.

- Williams, M. B., Rosé, J. R., Rott, L. S., Franco, M. A., Greenberg, H. B. and Butcher, E. C. (1998). The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, $\alpha 4\beta 7$. *J Immunol* 161(8): 4227-4235.
- Wilson, E. B., Yamada, D. H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B. J., Karp, C. L. and Brooks, D. G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340(6129): 202-207.
- Winkelmann, R., Sandrock, L., Porstner, M., Roth, E., Mathews, M., Hobeika, E., Reth, M., Kahn, M. L., Schuh, W. and Jäck, H.-M. (2011). B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Krüppel-like factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2): 710-715.
- Yanagawa, Y., Masubuchi, Y. and Chiba, K. (1998). FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology* 95(4): 591-594.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A. and Ghosh, S. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308(5728): 1626-1629.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303(5663): 1522-1526.

9 Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

1. Heidegger, S., Anz, D., Stephan, N., **Bohn, B.**, Herbst, T., Fendler, W. P., Suhartha, N., Sandholzer, N., Kobold, S., Hotz, C., Eisenacher, K., Radtke-Schuller, S., Endres, S. and Bourquin, C.
Virus-associated activation of innate immunity induces rapid disruption of Peyer's patches in mice.
Blood 2013. 122(15):2591-2599 (JIF: 9.775)
2. Heidegger, S., Kirchner, S. K., Stephan, N., **Bohn, B.**, Suhartha, N., Hotz, C., Anz, D., Sandholzer, N., Stecher, B., Russmann, H., Endres, S. and Bourquin, C.
TLR activation excludes circulating naive CD8+ T cells from gut-associated lymphoid organs in mice.
Journal of Immunology 2013. 190(19):5313-5320 (JIF: 5.362)

9.2 Posterpräsentation

Heidegger, S., **Bohn, B.**, Stephan, N., Anz, D., Krug, A., Endres, S. and Bourquin, C.
Virus-associated activation of innate immunity induces rapid degeneration of Peyer's patches.
World Immune Regulation Meeting-VI 2012 – Davos, Schweiz

9.3 Mündliche Präsentationen

1. **Bohn B.**, Heidegger, S., Anz, D., Stephan, N., Sandholzer, N., Radtke-Schuller, S., Endres, S. and Bourquin, C.
The role of B cell migration in poly(I:C) induced degeneration of the Peyer's patches.
Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 3rd Autumn School „Current Concepts in Immunology“ 2011 – Bad Schandau, Deutschland
2. **Bohn B.**, Heidegger, S., Anz, D., Stephan, N., Sandholzer, N., Radtke-Schuller, S., Endres, S. and Bourquin, C.
Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems durch synthetische Liganden führt zu schneller Degeneration intestinaler lymphatischer Organe.
Promotionsstudium "Molekulare Medizin" und "Systembiologische Medizin", Berichtskolloquium 2012 – Herrsching, Deutschland

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. Endres für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in der Abteilung für Klinische Pharmakologie anzufertigen. Die produktive und kollegiale Atmosphäre der Abteilung förderten die Freude an experimenteller Forschung in ganz besonderem Maße.

Meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin danke ich außerordentlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, ein interessantes und forderndes Forschungsthema zu bearbeiten. Auch für die Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre und die gemeinsame Teilnahme am „World Immune Regulation Meeting VI“ 2012 in Davos möchte ich ihr sehr danken. Ihre inspirierende und produktive Betreuung werden mir stets als Vorbild dienen.

Herrn Dr. Simon Heidegger danke ich ganz herzlich für die hervorragende Einarbeitung in die Thematik und Methoden und die äußerst engagierte und geduldige Betreuung über all die Jahre. Ihm verdanke ich viele experimentelle und wissenschaftliche Fähigkeiten, die mir die Promotion und das Verfassen dieser Dissertation ermöglichten.

Allen Mitarbeitern im Labor, Mitdoktoranden, Post-Docs und Arbeitsgruppenleitern möchte ich vor allem für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit danken.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank Bene und meiner Familie, auf deren emotionale und kulinarische Unterstützung ich in jeder Phase der Promotion zählen konnte.

Eidesstattliche Versicherung

Bohn, Bernadette Andrea Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Reversible Atrophie der Peyer-Plaques im Rahmen systemischer virusassoziierter Immunaktivierung: Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 26.06.2017
